



11002 U.S. PTO
09/960428
09/21/01

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 46 960.4

Anmeldetag: 22. September 2000

Anmelder/Inhaber: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH,
Mannheim/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung einer aktiven,
heterodimeren AMV-RT in prokaryotischen Zellen

IPC: C 12 N 15/70

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 02. August 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Verfahren zur Herstellung einer aktiven, heterodimeren AMV-RT in prokaryotischen Zellen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer rekombinanten aktiven heterodimeren AMV-RT durch Expression einer oder mehrerer für die α - und/oder β -Untereinheit(en) der AMV-RT kodierenden DNA-Sequenzen in prokaryotischen Zellen unter bestimmten Wachstums- und Induktionsbedingungen.

Die Entdeckung der Reversen Transkriptasen in den 70er Jahren widerlegte das "zentrale Dogma" der Molekularbiologie über den Informationstransfer von der DNA über RNA zum Protein als unidirektionalen Prozeß (Termin H. und Mizutani S., 1970 Nature 226:1211-1213; Baltimore D., 1970, Nature 226:1209-1211). Die enzymatische Charakterisierung dieser RNA-abhängigen DNA-Polymerasen ist die Basis des derzeitigen Verständnisses über den Vermehrungszyklus von RNA-Viren und somit auch über die Entstehung und Verbreitung von Krankheiten, die durch diese Viren-Gattung verursacht werden (Krebs, AIDS etc.).

Für Molekularbiologen sind diese Reversen Transkriptasen jedoch auch ein Werkzeug zur Synthese, Amplifikation und Klonierung von cDNAs (RT-PCR). Diese Technik erlaubt eine vereinfachte und beschleunigte Untersuchung von Genexpression in eukaryontischen Zellen. Nach Isolierung der gesamten mRNA aus Zellextrakten oder Geweben wird durch die Reverse Transkriptase die mRNA in cDNA "rückübersetzt" und durch den darauffolgenden PCR-Schritt amplifiziert, so daß eine Klonierung und Charakterisierung möglich ist. Dadurch entfällt einerseits die Aufklärung von Intron- und Exon-Strukturen der Gene, andererseits ist auch eine Untersuchung der Genexpression in der Zelle während verschiedener Lebenszyklen oder bei der Entstehung von Krankheiten (wie z.B. Krebs) möglich.

Reverse Transkriptasen (RT) aus drei verschiedenen Retroviren sind bislang genauer untersucht: Die RT aus *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV). Dieses Enzym besteht aus einer einzigen Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 78 kDa (Prasad V.R., 1993 reviewed in *Reverse Transcriptase*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 135). Ferner ist eine RT aus *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) bekannt. Diese RT ist ein Heterodimer, das sich aus zwei Untereinheiten, p66 und p51, zusammensetzt, wobei die Untereinheit p51

durch proteolytische Spaltung von p66 entsteht (Le Grice S.F.J., 1993 reviewed in *Reverse Transcriptase*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 163). Darüber hinaus sind RT's aus *Avian Sarcoma-Leukosis Virus* (ASLV) bekannt. Zu der Familie der ASLV gehört auch die aus *Avian Myeloblastosis Virus* (AMV) erhältliche RT. Diese RT ist ebenfalls ein Heterodimer, das sich aus einer α -Kette mit einem Molekulargewicht von ca. 63 kDa und einer β -Kette mit einem Molekulargewicht von ca. 95 kDa zusammensetzt. Auch hier entsteht die α -Kette durch proteolytische Prozessierung der β -Kette (Golomb M. und Grandgenett D., 1979, *J. Biol. Chem.* 254: 1606-1613; Weiss R. et al., eds. 1984, *Molecular biology of tumor viruses*, 2nd edition: *RNA tumor viruses 1/Text*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York).

Während die M-MLV-RT als Monomer und die HIV-RT als Heterodimer in *E. coli* exprimiert werden können, ist die Expression der AMV-RT als aktivem bzw. löslichem Heterodimeren in *E. coli* oder anderen Prokaryonten bislang nicht in zufriedenstellendem Maße möglich. Gemäß WO 00/42199 werden zwar bestimmte RT-Varianten in *E. coli*- bzw. bevorzugt in eukaryotischen Insektenzellen exprimiert, die gewünschte RT wird dabei jedoch mit überwiegend unlöslichem Anteil (ca. 90%) erhalten.

Ferner ist eine rekombinante AMV-RT in Zellrohextrakten von *E. coli* schwer meßbar, da zum einen eingesetzte RNA-Templates durch *E. coli*-eigene RNasen abgebaut werden und zum anderen *E. coli*-Stämme eine DNA-Polymerase besitzen, die neben der DNA-Polymerase-Aktivität auch eine RT-Aktivität aufweist (Ricchetti, M. und Huc, H., 1993, *EMBO J.* 12 (2), 387-396).

Diese *E. coli*-eigene RT-Aktivität stört somit die Bestimmung der Aktivität der rekombinanten AMV-RT in *E. coli*-Rohextrakten und in Fraktionen der Reinigung beträchtlich.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, eine rekombinante aktive heterodimere AMV-RT in ausreichenden Mengen zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung einer aktiven heterodimeren AMV-RT in prokaryotischen Wirtszellen, wobei eine oder mehrere DNA-Sequenz(en), die für die α - und β -Untereinheit bzw. -Kette der AMV-RT kodieren, in Expressionsplasmide kloniert werden, die Expressionsplasmide in prokaryotischen Zellen transformiert werden, die Expression der heterodimeren AMV-RT induziert wird und die rekombinante heterodimere AMVR-RT aus den Zellen aufgereinigt, d.h. isoliert wird. Geeignete Gene bzw. DNA-Sequenzen sind unter anderem solche, die nur für eine der AMV-RT-Untereinheiten kodieren. Ein Teil des Expressions-

produktes kann anschließend durch bestimmte Maßnahmen, wie z.B. proteolytische Spaltung der β -Kette, in die jeweils andere Untereinheit überführt werden. Als besonders geeignet haben sich für das erfindungsgemäße Verfahren die Sequenzen SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 5 erwiesen, welche zu einer aktiven heterodimeren AMV-RT bestehend aus den Untereinheiten SEQ ID NO: 6 und SEQ ID NO: 7 führt.

Die für die Untereinheiten der AMV-RT kodierenden Strukturgene bzw. DNA-Sequenzen können entweder auf unterschiedlichen, von einander getrennten Expressionsplasmiden oder einem Expressionsplasmid kloniert, gegebenenfalls in Gegenwart von sogenannten Helferplasmiden und in einer entsprechenden Wirtszelle exprimiert werden. Geeignete Expressionsplasmide sind beispielsweise pDS, pKK177-3 oder pKKT5. Erfindungsgemäß bevorzugt ist das Plasmid pKKT5, in welchem die jeweiligen Strukturgene unter Kontrolle des T5-Promotors insertiert sind. Weitere mögliche Promotoren, wobei es sich bevorzugt um IPTG induzierbare Promotoren handelt, sind beispielsweise der lac-, lac UV5- oder tac-Promotor. Optional zu verwendende Helferplasmide, wie z.B. das Plasmid pUBS520, und geeignete Selektionsmarker, wie beispielsweise Ampicillin oder Kanamycin, sind dem Fachmann prinzipiell bekannt.

Die Expressionsplasmide sowie gegebenenfalls weitere Helferplasmide werden in eine geeignete prokaryotische Wirtszelle transformiert. Bevorzugt wird erfindungsgemäß ein *E. coli*-Stamm, wie beispielsweise *E. coli* K12 C600, DH5 α , LE392, JM83, JM105, NM522, M15, RR1 Δ 15, UT5600, TG1, A1200 oder die Stämme *E. coli* B, BL21, HB 101 verwendet. Besonders bevorzugt ist erfindungsgemäß der *E. coli*-Stamm LE392.

Die Expression der heterodimeren AMV-RT kann durch verschiedene Maßnahmen induziert werden. Insbesondere positive Auswirkungen auf die Expression von aktiver AMV-RT haben bestimmte Wachstums- und Induktionsbedingungen. Eine Wachstumstemperatur im Bereich von 10° bis 25°C bei einer gleichzeitig erniedrigten Induktorkonzentration hat sich erfindungsgemäß als vorteilhaft erwiesen. Als besonders geeignet hat sich eine Wachstumstemperatur von etwa 15°C und eine Induktorkonzentration zwischen 0,1 und 0,5 mM, bevorzugt von etwa 0,15 mM erwiesen. Bevorzugt wird erfindungsgemäß IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) oder Lactose als Induktor eingesetzt.

Ferner hat sich gezeigt, daß die lösliche Expression der AMV-RT in prokaryotischen Zellen durch die Coexpression von Hilfsgenen gesteigert werden kann. Als mögliche Hilfsgene kommen insbesondere das trpT-Gen, das für die Tryptophan-tRNA kodiert, in Frage. Darüber hinaus sind

Chaperongene zur löslichen Expression geeignet, wie beispielsweise, die für GroEL und GroES, GrpE, ClpB, Dnak und DnaJ kodierenden Gene. Die Gene für ein oder mehrere Chaperone befinden sich dabei bevorzugt auf einem Helferplasmid mit induzierbarem Promotor, die Gene, die für die Chaperone GroEL und GroES kodieren, befinden sich unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors auf dem Expressionsplasmid, auf dem sich auch die Strukturgene für die α - und/oder β -Kette befinden. Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist jedoch, wenn die für GroEL und GroES kodierenden Gene auf dem Expressionsplasmid, das die Gene für die α - und β -Kette trägt, kloniert sind und die für Dnak, DnaJ, GrpE und ClpB kodierenden Gene auf einem Helferplasmid kloniert sind.

Zur Aufreinigung bzw. Isolierung der rekombinanten heterodimeren AMV-RT aus dem Zellextrakt werden – neben den dem Fachmann allgemein bekannten Maßnahmen – insbesondere geeignete Affinitätschromatographiematerialien wie metallionen-chelatisierende Materialien oder Kationenaustauscher verwendet. Besonders vorteilhaft für die Reinigung der AMV-RT ist, wenn die Expressionsprodukte, d.h. sowohl α - und β -Kette mit solchen Peptidsequenzen fusioniert sind, die zur reversiblen Bindung an bestimmte Säulenmaterialien, wie z.B. Kationenaustauscher, metallionenchelatisierende Materialien, wie Nickel-, Kupfer- oder Zink-Nitriloessigsäure-(NTA-) Harze, geeignet sind. Erfindungsgemäß geeignete Peptidsequenzen können von zwei bis etwa 100 Aminosäuren bzw. Aminosäurederivate aufweisen. Peptidsequenzen, die aus zwei bis zehn Aminosäuren, z.B. Argininresten oder Histidinresten bestehen, haben sich erfindungsgemäß als besonders geeignet erwiesen. Ferner hat sich als besonders geeignet erwiesen, wenn solche Peptidsequenzen, die aus acht Arginin- bzw. aus sechs Histidinresten bestehen, verwendet werden. Darüber hinaus sind auch kommerziell erhältliche Peptidsequenzen wie z.B. Strep-tag® (IBA GmbH, Göttingen/Deutschland) oder das GST-tag (Pharmacia, Uppsala/Schweden) für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

1. Beispiel:

Isolierung der Gene, die für α -Kette und β -Kette kodieren

Zur Isolierung der β -Kette wurden nach der Datenbank-Sequenz (MEDLINE ID 94366722, Baluda *et al.*, 1994) Oligonukleotide als Primer designed (s. SEQ ID NO: 1 und 2). Am 5'-Ende wurde eine EcoRI-Restriktionsendonukleaseschnittstelle und am 3'-Ende eine PstI-Restriktions-

endonukleaseschnittstelle für die spätere Klonierung in Vektoren eingebaut. Zusätzlich wurde ein weiterer 3'-primer designed (s. SEQ ID NO: 3), der die Isolierung der α -Kette ermöglicht. Beide Ketten wurden sowohl aus Virus-Lysat (ATCC VR-265) mittels RT-PCR wie auch aus einem *E. coli*-Klon (ATCC 31990), der die β -Kette auf einem Plasmid trägt, mittels PCR gefischt. Die PCR-Ansätze wurden auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, die PCR-Fragmente von ca. 1715 Bp für die α -Kette und ca. 2570 Bp für die β -Kette wurden aus dem Agarosegel isoliert (QIAEX II, Gel Extraction Kit, Qiagen/Deutschland), mit den o.a. Restriktionsendonukleasen nachgeschnitten und in ein ebenfalls mit *Eco*RI und *Pst*II linearisiertes und isoliertes Vektorfragment von pUC19 kloniert. Dazu wurden jeweils 1 μ l (20 ng) Vektorfragment und 3 μ l (100 ng) PCR-Fragment, 1 μ l 10x Ligase-Puffer (Maniatis *et al.*, 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press NY (USA), B.27), 1 μ l T4 DNA-Ligase, 4 μ l steriles $H_2O_{bidest.}$ pipettiert, vorsichtig gemischt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Die klonierten Gene wurde anschließend mittels Restriktionsanalyse und durch Sequenzierung untersucht. Die Sequenzen sind in SEQ ID NO: 4 (α -Kette) und SEQ ID NO: 5 (β -Kette) dargestellt.

Ein Vergleich mit der Datenbanksequenz (MEDLINE ID 94366722, Baluda, M.A., und Reddy, E.P., 1994, Oncogene 9:2761-2774) ergab für die α -Kette und für die β -Kette jeweils eine Homologie von 98,8 % auf DNA-Ebene. Wenn die daraus resultierenden Aminosäuresequenzen miteinander verglichen werden, so wird deutlich, daß die meisten Austausche auf DNA-Ebene sogenannte stumme Mutationen sind, d.h. zu keinem Aminosäureaustausch führen. Lediglich drei Basenaustausche führen auch zu Aminosäureaustauschen, sind aber reproduzierbar in jedem isolierten PCR-Produkt zu finden. Es handelt sich dabei um die Austausche Arg273Met, Arg304Gln und Asp495Glu. Die Aminosäuresequenzen beider Ketten sind in SEQ ID NO: 6 (α -Kette) und SEQ ID NO: 7 (β -Kette) dargestellt.

2. Beispiel:

Expression von α -Kette und β -Kette ohne fusionierte Peptidsequenzen (tags)

2.1. Konstruktion der Expressionsplasmide pAMV- α und pAMV- β

Zur Expression der AMV-RT wurden die Gene für beide Ketten getrennt in Expressionsvektoren so kloniert, daß die Strukturgene jeweils in der richtigen Orientierung unter Kontrolle des T5-

Promotors inseriert sind. Dazu wurde das jeweilige Strukturgen für die α - bzw. die β -Kette mittels *EcoRI* und *PstI* aus dem Plasmid pUC19 ausgeschnitten, die Restriktionsansätze durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das 1715 Bp große Fragment der α -Kette bzw. das 2570 Bp große Fragment der β -Kette aus dem Agarosegel isoliert. Zur Expression wurde das Expressionsplasmid pKKT5, welches aus pKK177-3 (Kopetzki *et al.*, 1989, *Mol. Gen. Genet.* 216: 149-155) durch Austausch des *tac*-Promotors durch den T5-Promotor aus pDS (Bujard *et al.*, 1987, *Methods Enzymol.* 155: 416-433) entstanden ist, eingesetzt. Die *EcoRI*-Restriktionsendonukleaseschnittstelle in der Sequenz des T5-Promotors wurde durch zwei Punktmutationen entfernt. Das so entstandene Expressionsplasmid wurde für die Insertion der Gene für die AMV-RT mit *EcoRI* und *PstI* geschnitten, der Restriktionsansatz durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das resultierende Vektorfragment von ca. 2500 Bp aus dem Agarosegel isoliert. Das so gewonnene Vektorfragment wurde wie beschrieben getrennt mit den in Beispiel 1 beschriebenen Genen für die α - und die β -Kette ligiert. Die ordnungsgemäße Insertion der Gene wurde mittels Restriktionskontrolle und Sequenzierung überprüft. Die so entstandenen Plasmide pAMV- α und pAMV- β wurden zunächst getrennt zur Expressionskontrolle in verschiedene *E. coli*-Stämme zusammen mit dem Helferplasmid pUBS520 cotransformiert. Denkbar ist hier die Expression von α -Kette bzw. β -Kette getrennt voneinander zur Gewinnung von $\alpha\alpha$ - bzw. $\beta\beta$ -Homodimeren. Das Helferplasmid pUBS520 (Brinkmann *et al.*, 1989, *Gene* 85: 109-114) trägt u.a. das *lacI^q*-Gen, das für den Lac-Repressor kodiert und das *dnaY*-Gen, das für die in *E. coli* seltene tRNA^{Arg} - erkennt die Codons AGA und AGG - kodiert (Garcia *et al.*, 1986, *Cell* 45: 453-459). Als Selektionsmarker wird das Kanamycin-Resistenzgen aus dem Transposon TN903 verwendet.

2.2. Transformation der Expressionsplasmide pAMV- α bzw. pAMV- β getrennt in *E. coli*

Kompetente Zellen verschiedener *E. coli*-Stämme wurden entsprechend der Methode nach Hanahan (*J. Mol. Biol.* 1983, Vol. 166, 557) hergestellt. 200 μ l derart hergestellter *E. coli* LE392-Zellen wurden mit 20 ng isolierter Expressionsplasmid-DNA pAMV- α bzw. pAMV- β und 40 ng Helferplasmid-DNA versetzt. Nach 30 min. Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock (90 sec bei 42°C). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium überführt und zur phänotypischen Expression 1 Stunde bei 37°C in LB-Medium inkubiert. Aliquote dieses Transformationsansatzes wurden auf LB-Platten mit Ampicillin und Kanamycin als Selektionsmarker ausplattiert und 15 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.3. Expression des Gens der α -Kette in *E. coli*

Zur Expression des Gens, das für die α -Kette der AMV-RT kodiert, wurden plasmidhaltige Klone in 3 ml LBampkan-Medium angeimpft und bei 30°C im Schüttler inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,5 (gemessen bei 550 nm, OD₅₅₀) wurden die Zellen mit 0,5 mM IPTG induziert und 4 h bei 30°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der einzelnen Expressionsklone bestimmt, ein Aliquot, das einer OD_{550nm} von 5.0/ml entspricht, entnommen und die Zellen abzentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde in 400 µl TE-Puffer (50 mM TRIS/50 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert, die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und durch Zentrifugation die lösliche Proteinfraction von der unlöslichen Proteinfraction getrennt (10 min, 14000 rpm, 4°C). Alle Fraktionen wurden mit SDS- und β -Mercaptoethanol-haltigen Auftragspuffer versetzt und die Proteine durch Kochen (5 min 100°C) denaturiert. Anschließend wurden je 10 µl mittels eines analytisches SDS-Gels (10 %) analysiert (Laemmli U.K., 1970, *Nature* 227:555-557).

Nach Auswertung des SDS-Gels ist eine klare Überexpression der α -Kette erkennbar. Bei ca. 63 kDa ist eine stark überexprimierte, zusätzliche Bande zu erkennen, die bei den nicht induzierten bzw. induzierten, aber nicht plasmidhaltigen Kontroll-Klonen nicht beobachtet wird. Ein geringer Anteil der überexprimierten α -Kette erscheint in der löslichen Proteinfraction, während der größte Anteil als unlöslich exprimiertes Protein anfällt.

2.4. Expression des Gens der β -Kette in *E. coli*

Zur Expression des Gens, das für die β -Kette der AMV-RT kodiert, wurden plasmidhaltige Klone in 3 ml LBampkan-Medium angeimpft und bei 30°C im Schüttler inkubiert. Bei einer OD_{550nm} von 0.5 wurden die Zellen mit 0,5 mM IPTG induziert und 4 h bei 30°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der einzelnen Expressionsklone, bestimmt, ein Aliquot, das einer OD_{550nm} von 5.0/ml entspricht, entnommen und die Zellen abzentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde in 400 µl TE-Puffer (50 mM TRIS/50 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert, die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und durch Zentrifugation die lösliche Proteinfraction von der unlöslichen Proteinfraction getrennt (10 min, 14000 rpm, 4°C). Alle Fraktionen wurden mit SDS- und β -Mercaptoethanol-haltigen Auftragspuffer versetzt und die Proteine durch Kochen (5 min 100°C) denaturiert. Anschließend wurden je 10 µl mittels eines analytisches SDS-Gels (8 %) analysiert (Laemmli U.K., 1970, *Nature* 227:555-557).

Nach Auswertung des SDS-Gels ist eine klare Überexpression der β -Kette erkennbar. Bei ca. 95 kDa ist eine stark überexprimierte, zusätzliche Bande zu erkennen, die bei den nicht induzierten bzw. induzierten, aber nicht plasmidhaltigen Kontroll-Klonen nicht beobachtet wird. Der größte Anteil der überexprimierten β -Kette erscheint in der unlöslichen Proteinfraction, jedoch ist auch eine geringe Überexpression in der löslichen Proteinfraction zu erkennen.

2.5. Expression beider Ketten auf getrennten Plasmiden in einer Zelle

Zur Expression beider Ketten in einer Zelle mußten zunächst die *lacI^q*-Expressionskassette und die *dnaY*-Expressionskassette aus dem Helferplasmid pUBS520 auf die Expressionsplasmide umkloniert werden. Dabei wurde die *lacI^q*-Expressionskassette auf pAMV- α und die *dnaY*-Expressionskassette auf das Expressionsplasmid pAMV- β kloniert. Um eine stabile Vermehrung der Expressionsplasmide zu gewährleisten, wurde das Ampicillin-Resistenzgen aus pAMV- α durch das Kanamycin-Resistenzgen aus pUBS520 ersetzt. Die so entstandenen Expressionsplasmide pAMV- α_{lacI^q} und pAMV- β_{dnaY} wurden anschließend in verschiedene *E. coli*-Expressionsstämme cotransformiert.

Zur Expression der Gene, die für die α -Kette und die β -Kette der AMV-RT codieren, wurden plasmidhaltige Klone in 3 ml LB_{ampkan}-Medium angeimpft und bei 30°C im Schüttler inkubiert. Bei einer OD_{550nm} von 0,5 wurden die Zellen mit 0,5 mM IPTG induziert und 4 h bei 30°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der einzelnen Expressionsklone bestimmt, ein Aliquot, das einer OD_{550nm} von 5,0/ml entspricht, entnommen und die Zellen abzentrifugiert (10 min 6000 rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde in 400 μ L TE-Puffer (50 mM TRIS/50 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert, die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und durch Zentrifugation die lösliche Proteinfraction von der unlöslichen Proteinfraction getrennt (10 min, 14000 rpm, 4°C). Alle Fraktionen wurden mit SDS- und β -Mercaptoethanol-haltigen Auftragspuffer versetzt und die Proteine durch Kochen (5 min 100°C) denaturiert. Anschließend wurden je 10 μ L mittels eines analytischen SDS-Gels (8 %) analysiert (Laemmli U.K., 1970, *Nature* 227:555-557).

Nach Auswertung des SDS-Gels ist überraschenderweise eine klare Überexpression der α - und der β -Kette erkennbar. Bei ca. 63 kDa und ca. 95 kDa sind stark überexprimierte, zusätzliche Banden zu erkennen, die bei den nicht induzierten bzw. induzierten, aber nicht plasmidhaltigen Kontroll-Klonen nicht zu erkennen sind. Die Verteilung der Banden in der löslichen bzw. der

unlöslichen Fraktion ist analog wie bei den Expressionsversuchen der beiden Ketten getrennt voneinander. Insgesamt ist die Expressionsleistung für beide Ketten etwas geringer als bei der getrennten Expression.

3. Beispiel:

Expression von α -Kette und β -Kette mit fusionierten tags zur vereinfachten Aufreinigung

3.1. Herstellung verschiedener Fusionsproteine

Zur effizienten Reinigung der rekombinanten AMV-RT-Heterodimere wurden beide Ketten am 5'-Ende mit geeigneten Peptidsequenzen, sogenannten tags fusioniert. Die Verwendung von tags ermöglicht dabei die Durchführung von Affinitätschromatographien. Eine Abfolge von zwei Affinitätschromatographien, die jeweils auf eines der beiden tags gerichtet sind, erlaubt darüber hinaus die Isolierung von reinen Heterodimeren (Wende W. et al., 1996, *Biol. Chem.* 377, 625 – 632). Über entsprechend entworfene primer wurden an die für die α -Kette acht Argininreste und an die β -Kette sechs Histidinreste mittels PCR-Reaktion angehängt. Die Sequenzen der sense-primer sind in SEQ ID NO: 8 (5'- primer für die α -Kette) und SEQ ID NO: 9 (5'-primer für die β -Kette) dargestellt. Als antisense-primer wurden die bereits zur Gen-Isolierung verwendeten Oligonukleotide SEQ ID NO: 2 (β -Kette) und SEQ ID NO: 3 (α -Kette) eingesetzt.

Die PCR-Ansätze wurden auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, die PCR-Fragmente von 1739 Bp für die α -Kette und 2597 Bp für die β -Kette wurden aus dem Agarosegel isoliert (QIAEX II, Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany), mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *PstI* nachgeschnitten und in ein ebenfalls mit *EcoRI* und *PstI* linearisiertes und isoliertes Vektorfragment des bevorzugten Expressionsplasmides kloniert. Dazu wurden jeweils 1 μ l (20 ng) Vektorfragment und 3 μ l (100 ng) PCR-Fragment, 1 μ l 10x Ligase-Puffer (Maniatis et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press NY (USA), B.27), 1 μ l T4 DNA-Ligase, 4 μ l steriles $H_2O_{bidest.}$ pipettiert, vorsichtig gemischt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Die klonierten Gene wurde anschließend mittels Restriktionsanalyse und durch Sequenzierung untersucht. Die so entstandenen Expressionsplasmide wurden pAMV- α lacIq-Arg und pAMV- β dnaY-His genannt.

3.2. Transformation der Expressionsplasmide pAMV- α lacIq-Arg und pAMV- β dnaY-His in verschiedenen *E. coli*-Expressionsstämmen

Kompetente Zellen verschiedener *E. coli*-Stämme wurden entsprechend der Methode nach Hanahan (*J. Mol. Biol.* 1983 , Vol. 166 pp. 557) hergestellt (s. Beispiel 2.2).

3.3. Expression beider Ketten mit fusionierten tags auf getrennten Plasmiden in einer Zelle

Zur Expression beider Ketten mit tags in einer Zelle wurden verschiedene *E. coli*-Expressionsstämmen mit den Expressionsplasmiden pAMV- α lacIq-Arg und pAMV- β dnaY-His cotransformiert.

Zur Expression der Gene, die für die α -Kette mit Arg-tag und die β -Kette mit His-tag der AMV-RT codieren, wurden plasmidhaltige Klone in 3 ml LBampkan-Medium angeimpft und bei 30°C im Schüttler inkubiert. Bei einer OD_{550nm} von 0,5 wurden die Zellen mit 0,5 mM IPTG induziert und 4 h bei 30°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der einzelnen Expressionsklone bestimmt, ein Aliquot, das einer OD₅₅₀ von 5/ml entspricht, entnommen und die Zellen abzentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde in 400 µl TE-Puffer (50 mM TRIS/50 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert, die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und durch Zentrifugation die lösliche Proteinfraction von der unlöslichen Proteinfraction getrennt (10 min, 14000 rpm, 4°C). Alle Fraktionen wurden mit SDS- und β -Mercaptoethanol-haltigen Auftragspuffer versetzt und die Proteine durch Kochen (5 min 100°C) denaturiert. Anschließend wurden je 10 µl über ein 8 % analytisches SDS-Gel analysiert (Laemmli U.K., 1970, *Nature* 227:555-557).

Nach Auswertung des SDS-Gels ist überraschenderweise eine klare Überexpression der α - und der β -Kette erkennbar. Bei ca. 63 kDa und ca. 95 kDa sind stark überexprimierte, zusätzliche Banden zu erkennen, die bei den nicht induzierten bzw. induzierten, aber nicht plasmidhaltigen Kontroll-Klonen nicht auftauchen. Die Verteilung der Banden in der löslichen bzw. der unlöslichen Fraktion ist analog wie bei den Expressionsversuchen mit beiden Ketten ohne tags in einer Zelle.

3.4. Expression der beiden Ketten mit fusionierten tags auf einem Plasmid

Die Verteilung der „Gene“ für die α - und β -Kette der AMV-RT auf zwei Plasmide könnte auf Grund von unterschiedlichen Stabilitäten dieser Plasmide zur Produktion von unterschiedlichen Mengen der jeweiligen Ketten und somit zur einer geringeren Ausbeute an $\alpha\beta$ -Ketten Heterodimer führen. Daher wurde mit Ausnahme des Gens für die β -Lactamase die gesamte genetische Information der beiden Plasmide pAMV- α lacIq-Arg und pAMV- β dnaY-His auf einem einzigen Plasmid, pAMV $\alpha\beta$ -1 vereinigt. Die Konstruktion dieses Plasmides erfolgte durch Insertion des *SspI*-*AflIII*-Fragmentes von pAMV- β dnaY-His, enthaltend die Sequenz für den T5-Promotor, das Gen kodierend für die β -Kette mit N-terminalen His-tag, die Sequenz für den *rrnB*-Terminator und das *dnaY*-Gen, in die *Sal*I-Schnittstelle von pAMV- α lacIq-Arg, enthaltend die Sequenz für den T5-Promotor, das Gen kodierend für die α -Kette mit N-terminalen Arg-tag, die Sequenz für den *rrnB*-Terminator, das Kanamycin-Resistenzgen und das *lacI^q*-Gen. Zu diesem Zweck wurden je 1 μ g der Expressionsplasmide pAMV- α lacIq-Arg und pAMV- β dnaY-His mit den oben beschriebenen Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben geschnitten, die Restriktionsansätze in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und das 4124 Bp große *SspI*-*AflIII*-Fragment von pAMV- β dnaY-His und das 6024 Bp große Fragment von pAMV- α lacIq-Arg aus dem Agrosegel isoliert (QIAEX II, Gel Extraction Kit, Qiagen/Deutschland). Die nicht kompatiblen Enden wurden mit Klenow-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH) nach Herstellerangaben aufbereitet und die beiden Fragmente wie oben beschrieben miteinander ligiert. Das neu entstandene Expressionsplasmid pAMV $\alpha\beta$ -1 wurde mittels Restriktionsanalyse untersucht.

Das nach Restriktionsanalyse korrekte Expressionsplasmid wurde wie oben beschrieben in den *E. coli*-K12-Stamm LE 392 transformiert und einer Expressionskontrolle unterzogen. Der Proteingehalt der Zellen nach 4 Stunden Wachstum unter induzierten Bedingungen wurde anschließend mittels SDS-PAGE untersucht. Nach SDS-PAGE-Analyse ist die Höhe der Expressionsleistung und die Verteilung in löslicher und unlöslicher Fraktion vergleichbar mit der Expression der Gene für α - und β -Kette auf getrennten Plasmiden, jedoch erscheint die Menge an exprimierter α - und β -Kette homogener.

Des weiteren wurde für die Reinigungsprozedur der Arg-tag der α -Kette analog zur β -Kette gegen einen His-tag ausgetauscht. Zu diesem Zweck wurde ein Zwischenkonstrukt, pAMV- α lacIq-His, erstellt, indem das *EcoRI*-*NheI*-Fragment aus pAMV- α lacIq-Arg gegen das *EcoRI*-*NheI*-Fragment

aus pAMV- $\beta_{dnaY-His}$ ausgetauscht wurde. Anschließend wurde analog zur Konstruktion von pAMV $\alpha\beta$ -1 mit Ausnahme des Gens für die β -Lactamase die gesamte genetische Information der beiden Plasmide pAMV- $\alpha_{lacIq-His}$ und pAMV- $\beta_{dnaY-His}$ auf einem einzigen Plasmid, pAMV $\alpha\beta$ -2 vereinigt. Der neu entstandene Expressionsvektor wurde pAMV $\alpha\beta$ -2 genannt. Zellen wurden wie oben beschrieben mit pAMV $\alpha\beta$ -2 transformiert und einer Expressionskontrolle nach Standardbedingungen unterzogen. Die Expressionsleistung war unter diesen Bedingungen nicht erhöht.

4. Beispiel: Expressionsoptimierung

4.1. Erhöhung der Expression an aktiver AMV-RT durch Veränderung der Expressionsbedingungen

Insbesondere positive Auswirkungen auf die Expression von aktiver AMV-RT haben besondere Wachstums- und Induktionsbedingungen. Danach wurde die Wachstumstemperatur während der Induktionsphase von 30°C auf 15°C gesenkt, die IPTG-Konzentration zur Induktion der Expression von 0,5 mM auf 0,15 mM erniedrigt und die Induktionszeit von 4 h auf 26 h erhöht. Der Proteingehalt der Zellen nach der Induktionsphase wurden wie oben beschrieben durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht.

Danach ist in der SDS-PAGE-Analyse wie erwartet die Gesamtexpressionsleistung von α - und β -Kette stark erniedrigt, der Gehalt an löslich exprimierter α - und β -Kette ist jedoch im Vergleich zu den Expressionsversuchen unter Standardwachstums- und Induktionsbedingungen deutlich erhöht. Diese Erhöhung der Expression von aktiver AMV-RT wurde auch bei der anschließenden Aufreinigung und Aktivitätsbestimmung bestätigt.

4.2. Erhöhung der Expression an aktiver AMV-RT durch Coexpression von Hilfsgenen

4.2.1. Coexpression des Gens für die Tryptophan-tRNA ($tRNA^{Trp}$)

Eine Eigenschaft der AMV-RT besteht darin, nach der Infektion einer eukaryontischen Wirtszelle eine zelleigene tRNA für Tryptophan ($tRNA^{Trp}$) als "primer" für die Polymerasereaktion zu

verwenden (Leis *et al.*, 1993, in: Reverse Transcriptase, Cold Spring Harbor Monograph Series, eds.: Skala, A.M. and Goff, S.P., Cold Spring Harbor NY (USA), 33-48). Ob die *E. coli* eigene tRNA^{trp} von der AMV-RT als "primer" verwendet werden kann, ist allerdings nicht nachgewiesen. In *E. coli* wird die tRNA^{trp} nur von einem einzigen Gen kodiert, *trpT*, dessen Expression an die normalen Bedürfnisse der Zelle angepaßt ist. Um eine eventuelle Verarmung der Zelle an tRNA^{trp} auszuschließen, wurde das *trpT*-Gen gemäß SEQ ID NO: 10 mittels PCR aus *E. coli* LE392 isoliert (die dafür verwendeten Primer sind in SEQ ID NO: 11 und 12 dargestellt), für die Insertion in pAMV α_{lacIq} -His mit *Pst*I nachgeschnitten und mit dem ebenfalls mit *Pst*I linearisierten Vektorfragment von pAMV α_{lacIq} -His wie oben beschrieben ligiert. Klone, die das *trpT*-Gen an der *Pst*I-Restriktionsendonukleaseschnittstelle integriert haben, wurden mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. In diesem Zwischenkonstrukt pAMV α_{lacIq} -His-*trpT* bilden das Gen für die α -Kette und das Gen für die *E. coli* tRNA^{trp} eine Transkriptionseinheit, deren Expression durch den IPTG induzierbaren T5-Promotor reguliert wird. Anschließend wurde analog zur Konstruktion von pAMV $\alpha\beta$ -1 bzw. pAMV $\alpha\beta$ -2 mit Ausnahme des Gens für die β -Lactamase die gesamte genetische Information der beiden Plasmide pAMV- α_{lacIq} -His-*trpT* und pAMV- β_{dnaY} -His auf einem einzigen Plasmid, pAMV $\alpha\beta$ -3 vereinigt. Zellen wurden wie oben beschrieben mit pAMV $\alpha\beta$ -3 transformiert und einer Expressionskontrolle nach den modifizierten Expressionsbedingungen unterzogen. Danach ist die Ausbeute an aktiver AMV-RT signifikant erhöht.

4.2.2. Coexpression von Chaperongenen

In *E. coli* gibt es mit der GroESL Maschinerie und einem 4-Komponentensystem, bestehend aus DnaK, DnaJ, GrpE und ClpB, zwei Hauptchaperonsysteme (Kedzierska, 1999). Beide sind sowohl an der korrekten Faltung neu entstehender Proteine, als auch an der Renaturierung streßbedingt aggregierter Proteine entscheidend beteiligt (Hartl F.U., 1996, Nature 381, 571-580; Bukau H. und Horwich A.L., 1998, Cell 92, 351-366; Mogk A. *et al.*, 1999, EMBO J. 18, 6934-6949; Zolkiewski M., 1999, J. Biol. Chem. 274, 28083-28086; Goloubinoff P. *et al.*, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 13732-13737).

In einem ersten Schritt sollte in den AMV-RT Produktionsstämmen das *groESL*-Operon aus *E. coli* überexprimiert werden. Dazu wurde das *Eco*RI-*Hind*III-Fragment aus pOF39 (Fayet O., Louarn J.-M., Georgopoulos C., 1986, Mol. Gen. Genet. Vol 202, pp. 335-345 in die *Ssp*I-Schnittstelle des Plasmids pAMV β_{dnaY} -His integriert. Die nicht kompatiblen Enden wurden vor Ligation

mit Klenow-Polymerase (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben aufbereitet. Die Sequenz von *groESL* ist in SEQ ID NO: 13 dargestellt. In diesem neuen Konstrukt, pAMV $\beta_{dnaY-His-groESL}$, bildet das *groESL*-Operon eine künstliche Transkriptionseinheit mit dem 3' gelegenen Gen für die β -Lactamase. Die Expression erfolgt entweder in Abhängigkeit vom jetzt 5' des *groESL*-Operon positionierten, *bla* eigenen, konstitutiven Promotor und/oder in Abhängigkeit des σ^{32} abhängigen Promotors des *groESL*-Operons. Wie oben beschrieben wurde anschließend wiederum mit Ausnahme des Gens für die β -Lactamase die gesamte genetische Information der beiden Expressionsplasmide pAMV $\alpha_{lacIq-His-trpT}$ und pAMV $\beta_{dnaY-His-groESL}$ auf einem einzigen Plasmid, pAMV $\alpha\beta$ -4, vereinigt.

Zellen wurden wie oben beschrieben mit pAMV $\alpha\beta$ -4 transformiert und einer Expressionskontrolle nach den modifizierten Expressionsbedingungen unterzogen. Die Coüberproduktion von GroESL bewirkte eine Steigerung der Biomasse und der Menge an aktiver AMV-RT. Im Vergleich zu den bisher besten Produktionsstämmen wurden nach Aufreinigung und Aktivitätstest drei bis viermal höhere Werte erzielt.

Nachdem sich die Coüberproduktion von GroESL in den AMV-RT Produktionsstämmen als positive Maßnahme erwiesen hatte, wurde in einem zweiten Schritt zusätzlich das andere Hauptchaperonsystem von *E. coli* coüberproduziert. Neben den mutmaßlich allgemeinen Vorteilen dieser Coüberproduktion, könnte damit ein Nachteil der GroESL Maschinerie, ihr Ausschlußvolumen von circa 65 kDa (Deuerling E. *et al.*, 1999, Nature 400, 693-696), ausgeglichen werden.

Dies dürfte vor allem bei der korrekten Faltung der β -Kette der AMV-RT (93 kDa) bedeutend sein, sofern sich diese nicht in einzelne, unabhängig voneinander bildende Domänen, unterteilen läßt. Entsprechend des physiologischen Zusammenspiels (Diamant S. und Goloubinoff P., 1998, Biochemistry 37, 9688-9694; Pierpaoli E.V. *et al.*, 1998, J. Biol. Chem. 273, 6643-6649) wurden die Gene für DnaK, DnaJ und GrpE in einem künstlichen Operon zusammengefaßt, während das Gen für ClpB eine eigene Transkriptionseinheit bildet. Für die koordinierte Expression mit den "Genen" für die Untereinheiten der AMV-RT wurden beide Transkriptionseinheiten unter die Kontrolle von IPTG induzierbaren T5-Promotoren gestellt.

Klonierungstechnische Gründe erforderten eine Reihe von Zwischenschritten auf dem Weg zum Endkonstrukt pCHAP-5. So wurden zunächst die pKKT5 Derivate pCHAP-1 und -2 konstruiert. pCHAP-1 enthält die genetische Information für das *dnaKJ* Operon aus *E. coli*, vom Startcodon für *dnaK* bis zum Stopcodon für *dnaJ*, pCHAP-2 trägt als Insert die künstliche Transkriptions-

einheit aus den kodierenden Bereichen der Gene für GrpE und ClpB; die entsprechenden DNA-Fragmente wurden über PCR aus genomischer DNA von *E. coli* K12 LE392 amplifiziert. Die Sequenz des *dnaKJ*-Operons ist in SEQ ID NO: 14, die entsprechenden Primer zur Isolierung des *dnaKJ*-Operons sind in SEQ ID NO: 15 und 16 dargestellt. Die Sequenz des *grpE*-Gens ist in SEQ ID NO: 17, die entsprechenden Primer zur Isolierung des *grpE* Gens sind in SEQ ID NO: 18 und 19 dargestellt. Die Sequenz des *clpB*-Gens ist in SEQ ID NO: 20, die entsprechenden Primer zur Isolierung des *clpB*-Gens sind in SEQ ID NO: 21 und 22 dargestellt. Zur Konstruktion von pCHAP-1 wurde das PCR-Fragment, enthaltend das *dnaKJ*-Operon, mit *SmaI* und *BamHI* nachgeschnitten und in ein ebenfalls mit *SmaI* und *BamHI* linearisiertes Vektorfragment von pKKT5 wie oben beschrieben ligiert. Die Konstruktion von pCHAP-2 erfolgte über eine Dreifachligation mit dem *EcoRI*-*PstI*-Fragment des *grpE*-Gens, dem *PstI*-*HindIII*-Fragment des *clpB*-Gens und dem mit *EcoRI* und *HindIII* linearisierten Vektorfragment von pKKT5. pCHAP-3, in der das *clpB*-Gen alleine als Transkriptionseinheit vorliegt, leitet sich aus pCHAP-2 ab, indem das *PstI*-*HindIII*-Fragment aus pCHAP-2 in das mit *EcoRI* und *HindIII* linearisierte Vektorfragment von pKKT5 wie oben beschrieben ligiert wurde. Vor der Ligationsreaktion wurden die nicht kompatiblen Enden der beiden Fragmente mit Klenow-Polymerase (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben aufbereitet. pCHAP-4 ist ein pCHAP-1 Derivat, dessen Insert um das *grpE* Gen aus pCHAP-2 erweitert wurde und somit die künstliche Transkriptionseinheit aus den Genen für DnaK, DnaJ und GrpE beinhaltet. Aufgrund der hier suboptimalen "Shine Dalgarno" Sequenz sollte die Expression von *grpE* im Vergleich zu pCHAP-2 reduziert sein und somit besser an die Expression von *dnaKJ* angepaßt sein (Diamant & Goloubinoff, 1998; Pierpaoli *et al.*, 1998). Zur Konstruktion von pCHAP-4 wurde das *EcoRI*-*AvaI*-Fragment aus pCHAP-2 in die *BamHI*-Schnittstelle von pCHAP-1 inseriert, nachdem die nicht kompatiblen Enden der beiden Fragmente mit Klenow-Polymerase (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben aufbereitet wurden. Das Endkonstrukt pCHAP-5 ist ein pCHAP-4 Derivat, das als zusätzliche genetische Information das Insert von pCHAP-3 beinhaltet. Dazu wurde durch Restriktion und Ligation wie mehrfach beschrieben das *BspLU11I*-*NdeI*-Fragment in pCHAP 4 gegen das *BspLU11I*-*SspI*-Fragment aus pCHAP-3 ausgetauscht. Um die Kompatibilität der Enden zu gewährleisten, wurde das durch *NdeI* erzeugte, überhängende Ende zuvor mit Klenow-Polymerase (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben aufgefüllt.

Untersuchungen zur Überproduktion von aktiver AMV-RT wurden in Abhängigkeit des Expressionplasmids pAMV $\alpha\beta$ -4 in Kombination mit den verschiedenen Helferplasmiden, pCHAP-1 bis -5, durchgeführt. Zumindest unter den abgeänderten Standardexpressionsbedingungen steigerten alle Helferplasmide die bisherigen Ausbeuten an aktiver AM-RT deutlich, wobei das

Helferplasmid pCHAP-5 wie erwartet das beste Ergebnis lieferte. Dies konnte sowohl durch SDS-PAGE wie auch durch die anschließende Aufreinigung mit Aktivitätsbestimmung bestätigt werden.

5. Beispiel: Analytische Methoden

5.1. Test auf Reverse Transkriptase-Aktivität (Test A)

Während der Reinigung wurde die Reverse Transkriptase-Aktivität in den Fraktionen mittels eines nicht-radioaktiven Testsystems detektiert. Dazu wurde der "Reverse Transcriptase Assay, non-radioactive" (Roche Molecular Biochemicals, Cat.No. 1468120) verwendet. Die Inkubationszeit wurde dabei auf 30 Minuten verkürzt.

5.2. Test auf Reverse Transkriptase-Aktivität (Test B)

Die spezifische Reverse Transkriptase-Aktivität der Pools wurde mittels eines radioaktiven Testsystems bestimmt. Reverse Transkriptase-Aktivität wurde in 100 µl Testvolumen (50 mM Tris/HCl, pH 8.3 (37°C), 40 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 0.5 mM dTTP, 0.04 OD_{260 nm} Poly (A) x dT₁₅, 0.1 µM [3H]-dTTP) bestimmt. AMV-RT (5 µl) wurde in geeigneten Verdünnungen zugegeben. Nach Inkubation für 10 min. bei 37°C wurde die Reaktion mit 10 % TCA-Lösung (500 µl) abgestoppt. Das gebildete, radioaktiv markierte Produkt wurde nach der Fällung auf Nitrocellulose-Filter gewaschen. Die Einbaurrate an Radioaktivität wurde im Szintillations-Zähler gemessen und die RT-Aktivität der Probe berechnet. Eine Enzymeinheit wurde dabei als die Menge an AMV-RT definiert, die in 10 min. bei 37°C den Einbau von 1.0 nMol TMP in säureunlösliches Produkt bewirkt.

5.3. Test auf DNA-Polymerase

Die Aktivität der DNA-Polymerase aus *E. coli* wurde durch Messung der Nick-Translation bestimmt. Dabei wurde die DNA-Polymerase mittels eines nicht-radioaktiven Nick-Translations-Tests nachgewiesen. Die Nick-Translation wurde in 50 µl Testvolumen durchgeführt (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM DTE, 28.875 µM DIG-dUTP, 1.444 µM Bio-16-dUTP, 95.865 µM dTTP, 20 µM dATP, 20 µM dCTP, 20 µM dGTP, 1 µg pBR322, 1 pg DNaseI). Nach

Zugabe der Proben (1 μ l) wurde die Reaktion für 30 min. bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Reaktionsansatz in Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten überführt. Die weitere Behandlung und Auswertung des Tests wurde analog dem "Reverse Transcriptase Assay, non-radioactive" (Roche Molecular Biochemicals, Cat.No. 1468120) durchgeführt.

5.4. Test auf kontaminierende Aktivitäten

Der Test auf das Vorhandensein von kontaminierenden Fremdaktivitäten wurde in einer Lösung bestehend aus 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTE durchgeführt.

Geeignete Proben der einzelnen Enzymfraktionen wurden mit den entsprechenden Nukleinsäuren inkubiert. Sogenannte Nicking-Aktivität wurde durch Inkubation mit dem Plasmid pBR322 (1 μ g) für 2-16 Stunden bei 37°C nachgewiesen. Unspezifische Nukleasen wurden durch Inkubation mit Lambda-DNA/*Eco*RI, *Hind*III (1 μ g) für 2-16 Stunden bei 37°C nachgewiesen. Unspezifische RNasen wurden durch Inkubation mit MSII-RNA (5 μ g) für 2-4 Stunden bei 37°C nachgewiesen.

Für den Test auf Kontamination mit Exonukleasen wurden die Proben mit 4 μ g [3H]-markierter DNA für 4 Stunden bei 37°C inkubiert und danach die freigesetzten [3H]-markierten Nukleotide bestimmt.

6. Beispiel: Reinigung und Funktionstest

6.1. AMV-RT aus *E. coli* LE392 pAMV- α_{lacIq} -Arg /pAMV- β_{dnaY} -His Konstrukt

6.1.1. Reinigung

Als Ausgangsmaterial für die Reinigung der rekombinanten AMV-RT wurden *E. coli*-Zellen verwendet, die beide Ketten der AMV-RT überexprimieren (siehe oben).

Die Reinigung der AMV-RT erfolgt bei 4°C. Das Reinigungsverfahren erfolgt nach Zellaufschluss und Abtrennung der Nukleinsäuren durch chromatographische Methoden. Das Reinigungsverfahren liefert eine rekombinante AMV-RT, die frei von kontaminierenden Enzymakti-

vitäten ist und in der RT-PCR die gleiche Funktionalität aufweist wie eine aus nativem Material gereinigte AMV-RT.

Puffer:

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 7.9, 0.5 M KCl, 0.02% Triton X-100, 20% Glycerin.

Puffer B: 20 mM Tris/HCl, pH 7.9, 0.25 M KCl, 0.02% Triton X-100, 10% Glycerin.

Puffer C: 20 mM Tris/HCl, pH 7.9, 0.25 M KCl, 0.02% Triton X-100, 10% Glycerin, 1 M Imidazol.

Puffer D: 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.02% Triton X-100, 10% Glycerin.

Puffer E: 20 mM Kaliumphosphat, pH 7.1, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.02% Triton X-100, 10% Glycerin.

Lagerpuffer: 200 mM Kaliumphosphat pH 7.2, 2 mM DTT, 0.2 % Triton X-100, 50 % Glycerin.

Aufschluß der Zellen:

Ca. 50 g Zellen von *E. coli* LE392 (pAMV- α_{lacIq} -Arg /pAMV- β_{dnaY} -His) wurden mit 200 ml Puffer A versetzt, aufgetaut und suspendiert. Die Suspension wurde mit zwei Tabletten Complete (Roche Molecular Biochemicals, Cat. No. 1697498) versetzt. Anschließend erfolgte der Aufschluß der Zellen mittels Ultraschall (Branson Sonicator) unter Kühlung (Temperatur: $<10^{\circ}\text{C}$). Der erreichte Aufschlußgrad der Zellsuspension betrug typischerweise 40-50 %.

Fällung von Nukleinsäuren:

Anschließend erfolgte eine Entfernung der Nukleinsäuren mittels Polyminfällung. 5 ml einer 10 %-igen Polymin-P-Lösung wurden tropfenweise zugegeben. Bei unvollständiger Fällung erfolgte eine weitere tropfenweise Zugabe. Nach Inkubation für 30 min bei 4°C erfolgte eine Zentrifugation (30 min, 13000 upm, 4°C).

Chromatographische Reinigungen:

Affinitätschromatographie an Ni-Chelat-Säule:

Der klare Zentrifugationsüberstand wurde mit Puffer B verdünnt (1+1) und auf eine mit Puffer B äquilibrierte und mit Nickel beladene Chelating Sepharose 6B-Säule (2.6 cm x 10 cm, Pharmacia) aufgezogen; danach wurde mit ca. 500 ml Puffer B, danach mit jeweils 200 ml Puffer B + 10 mM Imidazol und 200 ml Puffer B + 20 mM Imidazol gewaschen. Das Enzym wurde mit einem linearen Gradienten aus Puffer B + 20 mM Imidazol und Puffer C in einem Gesamtvolumen

men von 500 ml eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 5 ml pro Minute, die Fraktionsgröße 20 ml pro Fraktion. Das Enzym eluierte zwischen 50 mM und 200 mM Imidazol. Der Pool der aktiven Fraktionen wurde gegen Puffer D dialysiert.

Chromatographie an Heparin-Sepharose:

Der dialysierte Pool wurde danach auf eine mit Puffer D äquilibrierte Heparin-Sepharose ff-Säule (1.6 cm x 10 cm, Pharmacia) aufgezogen und mit ca. 200 ml Puffer D, danach mit ca. 200 ml Puffer D + 300 mM KCl gewaschen. Die Elution des Enzyms erfolgte mit einem linearen Gradienten aus Puffer D + 300 mM KCl und Puffer D + 1 M KCl in einem Gesamtvolumen von 200 ml. Die Fließgeschwindigkeit betrug 2.5 ml pro min, Fraktionsgröße 10 ml. Die AMV-RT eluierte bei einer KCl-Konzentration von 500 mM bis 700 mM.

Chromatographie an S-Sepharose ff:

Die RT-aktiven Fraktionen wurden gepoolt und gegen Puffer E dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine mit Puffer E äquilibrierte S-Sepharose ff-Säule (1.6 cm x 10 cm, Pharmacia) geladen. Nach dem Waschen mit ca. 200 ml Puffer E wurde das Enzym mit einem linearen Gradienten aus Puffer E und Puffer E + 1 M KCl in einem Gesamtvolumen von 400 ml eluiert. Die Fließgeschwindigkeit war 2.5 ml pro Minute, die Fraktionsgröße 10 ml.

Chromatographie an Hydroxylapatit:

Die RT-aktiven Fraktionen wurden gepoolt und gegen Puffer E dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine mit Puffer E äquilibrierte HA-Ultrogel-Säule (1.6 cm x 10 cm, Biosepra) geladen. Nach dem Waschen mit ca. 200 ml Puffer E wurde das Enzym mit einem linearen Gradienten aus Puffer E und Puffer E + 0.5 M Kaliumphosphat in einem Gesamtvolumen von 400 ml eluiert. Die Fließgeschwindigkeit war 2.5 ml pro Minute, die Fraktionsgröße 10 ml.

Die RT-aktiven Fraktionen wurden gepoolt und gegen Lagerpuffer dialysiert. Das gereinigte Protein wurde mit SDS- und β -Mercaptoethanol-haltigen Auftragspuffer versetzt und die Probe durch Kochen (5 min 100°C) denaturiert. Anschließend wurde je 20 μ l mittels eines analytisches SDS-Gels (4-20 %) analysiert (Laemmli U.K., 1970, *Nature* 227:555-557). Dabei wurden die α - und β -Untereinheiten der AMV-RT in äquimolaren Verhältnissen gefunden.

Die beschriebene Methode liefert eine stabile AMV-RT mit einer äquimolaren Verteilung der α - und β - Untereinheiten. Das erhaltene Enzym ist in der RT-PCR funktionsfähig.

6.1.2. Funktionstest in RT-PCR

Die erhaltene rekombinante AMV reverse Transkriptase wurde in einem Funktionstest untersucht. Der Funktionstest bestand aus einer Reversen Transkription (RT), gekoppelt mit einer Polymerasekettenreaktion (PCR). Dazu wurden 5 Einheiten der rekombinanten AMV reverse Transkriptase analog der Enzym-Mischung des Titan TM One Tube PCR System (Cat. No 1888382, Roche Molecular Biochemicals) eingesetzt. Amplifiziert wurde ein 1.8 kb großes Fragment des humanen Dystrophin-Genes. Als Template wurden 10 ng humane Muskel-RNA verwendet. Verwendete Primer (400 nM) waren Dys Primer 2rev (5'-GAG TGA ATA CAG TTT GCC CAT GGA TTG-3') und Dys Primer 8for (5'-AAG AAG TAG AGG ACT GTT ATG AAA GAG AAG-3'). Das Target wurde mit folgendem Programm in einer RT-PCR amplifiziert: 50°C für 30 min, 94°C für 2 min, gefolgt von 10 Zyklen (94°C für 10 sec, 58°C für 30 sec, 68°C für 1 min 10 sec) und 20 Zyklen (94°C für 10 sec, 58°C für 30 sec, 68°C für 1 min 10 sec; + 10 sec/Zyklus). Anschließend bei 68°C für 7 min Inkubiert. Die Reaktionsprodukte der RT-PCR wurden nach dem Abstoppen auf einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt (Abb. 1).

Abbildung 1 zeigt das Amplifikationsprodukt der RT-PCR mit einer Größe von 1.8 kb, erhalten mit nativ gereinigter AMV-RT (Spur 2) und rekombinant erhaltener AMV-RT (Spur 3). Die Spuren 1 und 4 zeigen einen DNA-Molekulargewichtsmarker VI (Cat. No. 1062590, Roche Molecular Biochemicals).

6.2. AMV-RT aus *E. coli* LE392 pAMV $\alpha\beta$ -4 +pCHAP-5 Konstrukt

6.2.1. Reinigung

Als Ausgangsmaterial für die Reinigung der rekombinanten AMV-RT wurden *E. coli* LE392 pAMV $\alpha\beta$ -4 +pCHAP-5 Zellen verwendet, die beide Ketten der AMV-RT überexprimieren (siehe oben).

Die Reinigung der AMV-RT erfolgt bei 4°C. Das Reinigungsverfahren erfolgt nach Zellaufschluss und Abtrennung der Nukleinsäuren durch chromatographische Methoden. Das Reinigungsverfahren liefert eine rekombinante AMV-RT, die frei von kontaminierenden Enzymaktivitäten ist und in der RT-PCR die gleiche Funktionalität aufweist wie eine aus nativem Material gereinigte AMV-RT.

Puffer:

Puffer A: 50 mM NaPO₄, pH 7,2, 1 M NaCl, 3 mM 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerin.

Puffer B: 50 mM NaPO₄, pH 5,0, 1 M NaCl, 3 mM 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerin

Puffer C: 50 mM NaPO₄, pH 6,0, 1 M NaCl, 3 mM 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerin
0,2 M Imidazol.

Puffer D: 50 mM NaPO₄, pH 7,7, 1 M NaCl, 3 mM 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerin
0,5 M Imidazol.

Puffer E: 50 mM NaPO₄, pH 6,0, 3 mM 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerin

Lagerpuffer: 200 mM Kaliumphosphat pH 7,2, 2 mM DTT, 0,2 % Triton X-100, 50 % Glycerin.

Aufschluß der Zellen:

Ca. 50 g Zellen von *E. coli* LE392 pAMV $\alpha\beta$ -4 +pCHAP-5 wurden mit 400 ml Puffer A versetzt, aufgetaut und suspendiert. Die Suspension wurde mit zwei Tabletten Complete (Roche Molecular Biochemicals, Cat. No. 1697498) versetzt. Anschließend erfolgte der Aufschluß der Zellen mittels Ultraschall (Branson Sonicator) unter Kühlung (Temperatur: <10°C). Der erreichte Aufschlußgrad der Zellsuspension betrug typischerweise 40-50 %.

Fällung von Nukleinsäuren:

Anschließend erfolgte eine Entfernung der Nukleinsäuren mittels Polyminfällung. 5 ml einer 10 %-igen Polymín-P-Lösung wurden tropfenweise zugegeben. Bei unvollständiger Fällung erfolgte eine weitere tropfenweise Zugabe. Nach Inkubation für 30 min bei 4°C erfolgte eine Zentrifugation (30 min, 13000 upm, 4°C).

*Chromatographische Reinigungen:**Affinitätschromatographie an Ni-Chelat-Säule:*

Der klare Zentrifugationsüberstand wurde auf eine mit Puffer A äquilibrierte und mit Nickel beladene Chelating Sepharose ff-Säule (2.6 cm x 10 cm, Pharmacia) aufgezogen; danach wurde mit ca. 500 ml Puffer A, danach mit jeweils 500 ml Puffer B und 500 ml Puffer C gewaschen. Das Enzym wurde mit Puffer D in einem Gesamtvolumen von 500 ml eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 5 ml pro Minute, die Fraktionsgröße 20 ml pro Fraktion. Der Pool der aktiven Fraktionen wurde gegen Puffer E dialysiert.

Chromatographie an Heparin-Sepharose:

Der dialysierte Pool wurde danach auf eine mit Puffer E + 250 mM NaCl äquilibrierte Heparin-Sepharose ff-Säule (1.6 cm x 10 cm, Pharmacia) aufgezogen und mit ca. 200 ml Puffer E + 250 mM NaCl gewaschen. Die Elution des Enzyms erfolgte mit einem linearen Gradienten aus Puffer E und 250 mM NaCl und Puffer E und 1 M NaCl in einem Gesamtvolumen von 200 ml. Die Fließgeschwindigkeit betrug 2.5 ml pro min, Fraktionsgröße 10 ml. Die AMV-RT eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 500 mM bis 700 mM.

Die RT-aktiven Fraktionen wurden gepoolt und gegen Lagerpuffer dialysiert. Das gereinigte Protein wurde mit SDS- und 2-Mercaptoethanol-haltigen Auftragspuffer versetzt und die Probe durch Kochen (5 min 100°C) denaturiert. Anschließend wurde je 20 µl mittels eines analytisches SDS-Gels (4-20 %) analysiert (Laemmli U.K., 1970, *Nature* 227:555-557). Dabei wurden die α - und β -Untereinheiten der AMV-RT in äquimolaren Verhältnissen gefunden. (Abb. 2, Spur 6).

Abbildung 2 zeigt ein SDS-Gel mit Proben aus der AMV-RT Aufreinigung.

Spur 1: Molekulargewichtsmarker

Spur 2: AMV nativ

Spur 3: Zellaufschluss

Spur 4: Ni-Chelat Sepharose, Wasch mit Puffer C

Spur 5: Ni-Chelat Pool

Spur 6: AMV-RT rec., Endpräparat

Die beschriebene Methode liefert eine stabile AMV-RT mit einer äquimolaren Verteilung der α - und β - Untereinheiten. Das erhaltene Enzym ist in der RT-PCR funktionsfähig.

6.2.2. Funktionstest in RT-PCR

Die erhaltene rekombinante AMV reverse Transkriptase wurde in einem Funktionstest untersucht. Der Funktionstest bestand aus einer reversen Transkription (RT), gefolgt von einer Polymerasekettenreaktion (PCR). Dazu wurden 10 Einheiten der rekombinanten AMV reverse Transkriptase eingesetzt. Amplifiziert wurde ein 8 kb, 10 kb, 12 kb und ein 13,5 kb großes Fragment des humanen Dystrophin-Genes.

Als Template wurden 1 µg humane Muskel-RNA verwendet. Verwendete Primer (400 nM) waren Dys Primer 2 for (5'-CAA TCC ATG GGC AAA CTG TAT TCA CTC -3') und Dys

Primer 5 rev (5'-CGT CCC GTA TCA TAA ACA TTC AGC AGC-3') für 8 kb, Dys Primer 8 for (5'-AAG AAG TAG AGG ACT GTT ATG AAA GAG AA-3') und 5 rev für 10 kb, Dys Primer 8 for und Dys Primer 9 rev (5'-AGC AGG TAA GCC TGG ATG ACT GAC TAG AAG-3') für 12 kb und Dys Primer 8 for und 10 rev (5'-AAT CAA TCA ACC AAC CGA AAT CTC ACT CTG-3') für 13,5 kb. Die cDNA Synthese erfolgt bei 42°C für 60 min.

Die Durchführung der cDNA Synthese erfolgte nach Vorgaben der Produktinformation für AMV reverse Transcriptase (Cat. No. 1495062, Roche Molecular Biochemicals).

Für die PCR wurde das Expand Long Template PCR System (Cat. No. 1681834, Roche Molecular Biochemicals) verwendet. Das Target wurde mit folgendem PCR-Programm amplifiziert: 94°C für 2 min, gefolgt von 10 Zyklen (94°C für 10 sec, 60°C für 30 sec, 68°C für 10 min) und 20 Zyklen (94°C für 10 sec, 60°C für 30 sec, 68°C für 10 min 10 + 10 sec/Zyklus). Anschließend bei 68°C für 5 min Inkubiert. Die Reaktionsprodukte der RT-PCR wurden nach dem Abstoppen auf einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt (Abb. 3). Die Spuren 3 und 6 zeigen einen DNA-Molekulargewichtsmarker X (Cat. No. 1498037, Roche Molecular Biochemicals).

Abbildung 3 zeigt ein Agarose-Gel, auf dem die Reaktionsprodukte der RT-PCT mit rekomb. AMV-RT aufgetrennt wurden; Spur 1: 8 Kb Amplifikationsprodukt, Spur 2: 10 Kb Amplifikationsprodukt, Spur 3: DNA Längenstandard X, Spur 4: 12 Kb Amplifikationsprodukt, Spur 5: 13,5 Kb Amplifikationsprodukt, Spur 6: DNA Längenstandard X.

SEQUENCE LISTING

<110> Roche Diagnostics GmbH

<120> Verfahren zur Herstellung einer aktiven, heterodimeren
AMV-RT in prokaryotischen Zellen

<130> 5272/00/DE

<140>

<141>

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 1

gatgactgga attcatgact gttgcgctac atctggct

38

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 2

gatgactgct gcagttatta tgcaaaaaga gggctcgccct

40

<210> 3

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 3

gatgactgct gcagttatta atacccttga aaggctggctt g

41

<210> 4

<211> 1716

<212> DNA

<213> Avian Myeloblastosis Virus

<400> 4

actgttgcgc tacatctgga tattccgctc aaatggaagc caaaccacac gcctgtgtgg 60
 attgaccagt ggccccttcc tgaaggtaaa cttgtagcgc taacgcaatt agtggaaaaa 120
 gaattacagt taggacatat agaaccctca cttagttgct ggaacacacg tgtctttgtg 180
 atccggaagg cttccgggtc ttatcgctta ttgcatgact tgcgcgctgt taacgctaag 240
 cttgttccct ttggggccgt ccaacagggg gcgcgggttc tctccgcgct cccgcgtggc 300
 tggcccctga tggctcctaga cctcaaggat tgettctttt ctattcctct tgcggaacaa 360
 gatcggaag cttttgcatt taagctcccc tctgtgaata accaggcccc cgtcgaaga 420
 ttccaatgga aggtcttgcc ccaagggatg acctgttctc ccactatctg tcagttgata 480

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| gtgggtcaaa | tacttgagcc | cttgagactc | aagcaccocat | ctctggccat | gttgccattat | 540 |
| atggatgata | ttttgctagc | cgccccaagt | catgatgggt | tggaaagcgc | aggggaggag | 600 |
| gttatcagta | cattggaaag | agccgggttc | accattttgc | ctgataaggt | ccagaggagg | 660 |
| cccgaggtac | aatatcttgg | gtacaagtta | ggcagtaagt | atgtagcacc | cgtaggcctg | 720 |
| gtagcagaac | ccaggatagc | caacttjtg | gatgttcaga | agctjgtggg | gtcaacttcag | 780 |
| tjggcttcgcc | cagcgctagg | aatcccgcc | cgactgatgg | gcccccttta | tgagcagtta | 840 |
| cgagggtcag | atcccaacga | ggcgaggga | tjggaatctag | acatgaaaat | ggcctggaga | 900 |
| gagatcgtag | agctcagcac | caactgctgc | ttggaaacgat | gggacccctgc | cctgcctctg | 960 |
| gaaggagcgg | tcgctagatg | tgaacagggg | gcaatagggg | tcctgggaca | gggactgtcc | 1020 |
| acacacccaa | ggccatgttt | gtggttatct | tcaccccaac | ccaccaaggc | gtttactgct | 1080 |
| tggttagaag | tgtccaccc | tttgattact | aagctacgtg | cttcggcagt | gcgaacccctt | 1140 |
| ggcaaggagg | ttgatattct | cctgttgcc | gcatgctttc | gggaggacct | tcgcctcccg | 1200 |
| gaggggatcc | tgttagccct | taggggggtt | gcaggaaaaa | tcaggagtag | tgacacgcca | 1260 |
| tcctatttttg | acattggcgg | tcactgcat | gtttctctga | aagtggagggt | taccgaccac | 1320 |
| cctgtaccgg | gacccactgt | ctttaccgac | gcctcctcaa | gcacccataa | gggggtggta | 1380 |
| gtctggaggg | agggcccaag | gtgggagata | aaagaaatag | ctgatttggg | ggcaagtgtta | 1440 |
| caacaactgg | aagcacgcgg | tgtggccatg | gcacttctgc | tgtggccgac | aacgcccact | 1500 |
| aatgtagtga | ctgactctgc | gtttgttgcg | aaaatgttac | tcaagatggg | gcaggaggga | 1560 |
| gtcccgctta | cagcggcggg | ttttatttta | gaggatgcgt | taagccaaag | gtcagccatg | 1620 |
| gcgcgcgttc | tcacgtgcgg | gagtcattct | gaggtgccag | ggtttttcac | agaaggaaat | 1680 |
| gacgtggcag | atagccaagc | cacctttcaa | gcgtat | | | 1716 |

<210> 5

<211> 2574

<212> DNA

<213> Avian Myeloblastosis Virus

<400> 5

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| actgttgccg | tacatctggg | tattccgctc | aaatggaagc | caaaccacac | gcctgtgtgg | 60 |
| attgaccagt | ggccctctcc | tgaaggtaaa | cttgtagcgc | taacgcaatt | agtggaaaaa | 120 |
| gaattacagt | taggacatat | agaaccttca | cttagttgct | ggaacacacc | tgtctttgtg | 180 |
| atccgggaagg | cttcgggggc | ttatcgctta | ttgcatgact | tgcgcgctgt | taacgctaag | 240 |
| cttgttcctt | ttggggccgt | ccaacagggg | gcgcgggttc | tctccgcgct | cccgcggtgg | 300 |
| tggcccttga | tggctctaga | cctcaaggat | tgtttctttt | ctattcctct | tggggaacaa | 360 |
| gatcgogaag | cttttgcat | tacgtccccc | tctgtgaata | accaggcccc | cgctcgaaga | 420 |
| ttccaatgga | aggtcttggc | ccaagggatg | acctgtttct | ccactatctg | tcagttgata | 480 |
| gtgggtcaaa | tacttgagcc | cttgagactc | aagcaccocat | ctctgcgcct | gttgccattat | 540 |
| atggatgata | ttttgctagc | cgccccaagt | catgatgggt | tggaaagcgc | aggggaggag | 600 |
| gttatcagta | cattggaaag | agccgggttc | accattttgc | ctgataaggt | ccagaggagg | 660 |
| cccgaggtac | aatatcttgg | gtacaagtta | ggcagtaagt | atgtagcacc | cgtaggcctg | 720 |
| gtagcagaac | ccaggatagc | caacttjtg | gatgttcaga | agctjgtggg | gtcaacttcag | 780 |
| tjggcttcgcc | cagcgctagg | aatcccgcc | cgactgatgg | gcccccttta | tgagcagtta | 840 |
| cgagggtcag | atcccaacga | ggcgaggga | tjggaatctag | acatgaaaat | ggcctggaga | 900 |
| gagatcgtag | agctcagcac | caactgctgc | ttggaaacgat | gggacccctgc | cctgcctctg | 960 |
| gaaggagcgg | tcgctagatg | tgaacagggg | gcaatagggg | tcctgggaca | gggactgtcc | 1020 |
| acacacccaa | ggccatgttt | gtggttatct | tcaccccaac | ccaccaaggc | gtttactgct | 1080 |
| tggttagaag | tgtccaccc | tttgattact | aagctacgtg | cttcggcagt | gcgaacccctt | 1140 |
| ggcaaggagg | ttgatattct | cctgttgcc | gcatgctttc | gggaggacct | tcgcctcccg | 1200 |
| gaggggatcc | tgttagccct | taggggggtt | gcaggaaaaa | tcaggagtag | tgacacgcca | 1260 |
| tcctatttttg | acattggcgg | tcactgcat | gtttctctga | aagtggagggt | taccgaccac | 1320 |
| cctgtaccgg | gacccactgt | ctttaccgac | gcctcctcaa | gcacccataa | gggggtggta | 1380 |
| gtctggaggg | agggcccaag | gtgggagata | aaagaaatag | ctgatttggg | ggcaagtgtta | 1440 |
| caacaactgg | aagcacgcgg | tgtggccatg | gcacttctgc | tgtggccgac | aacgcccact | 1500 |
| aatgtagtga | ctgactctgc | gtttgttgcg | aaaatgttac | tcaagatggg | gcaggaggga | 1560 |
| gtcccgctta | cagcggcggg | ttttatttta | gaggatgcgt | taagccaaag | gtcagccatg | 1620 |
| gcgcgcgttc | tcacgtgcgg | gagtcattct | gaagtgccag | ggtttttcac | agaaggaaat | 1680 |
| gacgtggcag | atagccaagc | cacctttcaa | gcgtat | | | 1740 |
| cataccgctc | tcctatctcg | accccgcgcg | ctatccaaaag | cggtgtaatat | atctatgcag | 1800 |
| caggctatagg | agttgtttca | gaactggccg | cattgttaatt | cagccccctgc | cttgaggggc | 1860 |
| ggggtaaaac | ctagggtttt | gggaaccccta | cagtatgtgc | agacagactt | tacactagag | 1920 |
| cctagaatgg | ctcccggttc | ctggctcgtc | gttactgtgg | ataccgcctc | atctggcgata | 1980 |
| gtcgtaactc | agcatggcgg | tgtccacatc | gttgctgcac | aacatcattg | ggccacgctc | 2040 |
| atcgccggtt | tjggaaagac | aaaggccata | aaaacagata | atgggtcctg | cttcacgtct | 2100 |

```

aaatccacgc gagagtggct cgcgagatgg gggatagcac acaccaccgg gattccgggt 2160
aattcccagg gtcaagctat ggtagagcgg gccaaccggc tctgaaaga taagatccgt 2220
gtgcttgccg agggggatgg ctttatgaaa agaaccacca ccagcaaaaca gggggaacta 2280
ttagccaaagg caatgtatgc ccttaatcac tttagagcgtg gtgaaaacac aaaaacaccg 2340
atacaaaaac actggagacc taccggttctt acagaaggac ccccggttaa aatacgaata 2400
gagacagggg agtgggaaaa aggatggaac gtgctggctc ggggacgagg ttatgcagct 2460
gtgaaaaaaca gggacactga taaggttatt tgggtacct ctcgaaaagt taaaccggac 2520
atcgcccaaaa aggatgaggt gactaagaaa gatgaggcga gcctctcttt tgca 2574

```

<E10> 6

<E11> 572

<E12> PRT

<E13> Avian Myeloblastosis Virus

<400> 6

```

Thr Val Ala Leu His Leu Ala Ile Pro Leu Lys Trp Lys Pro Asn His
  1             5             10             15

```

```

Thr Pro Val Trp Ile Asp Gln Trp Pro Leu Pro Glu Gly Lys Leu Val
      20             25             30

```

```

Ala Leu Thr Gln Leu Val Glu Lys Glu Leu Gln Leu Gly His Ile Glu
      35             40             45

```

```

Pro Ser Leu Ser Cys Trp Asn Thr Pro Val Phe Val Ile Arg Lys Ala
      50             55             60

```

```

Ser Gly Ser Tyr Arg Leu Leu His Asp Leu Arg Ala Val Asn Ala Lys
      65             70             75             80

```

```

Leu Val Pro Phe Gly Ala Val Gln Gln Gly Ala Pro Val Leu Ser Ala
      85             90             95

```

```

Leu Pro Arg Gly Trp Pro Leu Met Val Leu Asp Leu Lys Asp Cys Phe
     100             105             110

```

```

Phe Ser Ile Pro Leu Ala Glu Gln Asp Arg Glu Ala Phe Ala Phe Thr
     115             120             125

```

```

Leu Pro Ser Val Asn Asn Gln Ala Pro Ala Arg Arg Phe Gln Trp Lys
     130             135             140

```

```

Val Leu Pro Gln Gly Met Thr Cys Ser Pro Thr Ile Cys Gln Leu Ile
     145             150             155             160

```

```

Val Gly Gln Ile Leu Glu Pro Leu Arg Leu Lys His Pro Ser Leu Arg
     165             170             175

```

```

Met Leu His Tyr Met Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ser His Asp
     180             185             190

```

```

Gly Leu Glu Ala Ala Gly Glu Glu Val Ile Ser Thr Leu Glu Arg Ala
     195             200             205

```

```

Gly Phe Thr Ile Ser Pro Asp Lys Val Gln Arg Glu Pro Gly Val Gln
     210             215             220

```

```

Tyr Leu Gly Tyr Lys Leu Gly Ser Thr Tyr Val Ala Pro Val Gly Leu
     225             230             235             240

```

```

Val Ala Glu Pro Arg Ile Ala Thr Leu Trp Asp Val Gln Lys Leu Val
     245             250             255

```

Gly Ser Leu Gln Trp Leu Arg Pro Ala Leu Gly Ile Pro Pro Arg Leu
 260 265 270
 Met Gly Pro Phe Tyr Glu Gln Leu Arg Gly Ser Asp Pro Asn Glu Ala
 275 280 285
 Arg Glu Trp Asn Leu Asp Met Lys Met Ala Trp Arg Glu Ile Val Gln
 290 295 300
 Leu Ser Thr Thr Ala Ala Leu Glu Arg Trp Asp Pro Ala Leu Pro Leu
 305 310 315 320
 Glu Gly Ala Val Ala Arg Cys Glu Gln Gly Ala Ile Gly Val Leu Gly
 325 330 335
 Gln Gly Leu Ser Thr His Pro Arg Pro Cys Leu Trp Leu Phe Ser Thr
 340 345 350
 Gln Pro Thr Lys Ala Phe Thr Ala Trp Leu Glu Val Leu Thr Leu Leu
 355 360 365
 Ile Thr Lys Leu Arg Ala Ser Ala Val Arg Thr Phe Gly Lys Glu Val
 370 375 380
 Asp Ile Leu Leu Leu Pro Ala Cys Phe Arg Glu Asp Leu Pro Leu Pro
 385 390 395 400
 Glu Gly Ile Leu Leu Ala Leu Arg Gly Phe Ala Gly Lys Ile Arg Ser
 405 410 415
 Ser Asp Thr Pro Ser Ile Phe Asp Ile Ala Arg Pro Leu His Val Ser
 420 425 430
 Leu Lys Val Arg Val Thr Asp His Pro Val Pro Gly Pro Thr Val Phe
 435 440 445
 Thr Asp Ala Ser Ser Ser Thr His Lys Gly Val Val Val Trp Arg Glu
 450 455 460
 Gly Pro Arg Trp Glu Ile Lys Glu Ile Ala Asp Leu Gly Ala Ser Val
 465 470 475 480
 Gln Gln Leu Glu Ala Arg Ala Val Ala Met Ala Leu Leu Leu Trp Pro
 485 490 495
 Thr Thr Pro Thr Asn Val Val Thr Asp Ser Ala Phe Val Ala Lys Met
 500 505 510
 Leu Leu Lys Met Gly Gln Glu Gly Val Pro Ser Thr Ala Ala Ala Phe
 515 520 525
 Ile Leu Glu Asp Ala Leu Ser Gln Arg Ser Ala Met Ala Ala Val Leu
 530 535 540
 His Val Arg Ser His Ser Glu Val Pro Gly Phe Phe Thr Glu Gly Asn
 545 550 555 560
 Asp Val Ala Asp Ser Gln Ala Thr Phe Gln Ala Tyr
 565 570

<210> 7
 <211> 858
 <212> PRT
 <213> Avian Myeloblastosis Virus

<400> 7
 Thr Val Ala Leu His Leu Ala Ile Pro Leu Lys Trp Lys Pro Asn His
 1 5 10 15
 Thr Pro Val Trp Ile Asp Gln Trp Pro Leu Pro Glu Gly Lys Leu Val
 20 25 30
 Ala Leu Thr Gln Leu Val Glu Lys Glu Leu Gln Leu Gly His Ile Glu
 35 40 45
 Pro Ser Leu Ser Cys Trp Asn Thr Pro Val Phe Val Ile Arg Lys Ala
 50 55 60
 Ser Gly Ser Tyr Arg Leu Leu His Asp Leu Arg Ala Val Asn Ala Lys
 65 70 75 80
 Leu Val Pro Phe Gly Ala Val Gln Gln Gly Ala Pro Val Leu Ser Ala
 85 90 95
 Leu Pro Arg Gly Trp Pro Leu Met Val Leu Asp Leu Lys Asp Cys Phe
 100 105 110
 Phe Ser Ile Pro Leu Ala Glu Gln Asp Arg Glu Ala Phe Ala Phe Thr
 115 120 125
 Leu Pro Ser Val Asn Asn Gln Ala Pro Ala Arg Arg Phe Gln Trp Lys
 130 135 140
 Val Leu Pro Gln Gly Met Thr Cys Ser Pro Thr Ile Cys Gln Leu Ile
 145 150 155 160
 Val Gly Gln Ile Leu Glu Pro Leu Arg Leu Lys His Pro Ser Leu Arg
 165 170 175
 Met Leu His Tyr Met Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ser His Asp
 180 185 190
 Gly Leu Glu Ala Ala Gly Glu Glu Val Ile Ser Thr Leu Glu Arg Ala
 195 200 205
 Gly Phe Thr Ile Ser Pro Asp Lys Val Gln Arg Glu Pro Gly Val Gln
 210 215 220
 Tyr Leu Gly Tyr Lys Leu Gly Ser Thr Tyr Val Ala Pro Val Gly Leu
 225 230 235 240
 Val Ala Glu Pro Arg Ile Ala Thr Leu Trp Asp Val Gln Lys Leu Val
 245 250 255
 Gly Ser Leu Gln Trp Leu Arg Pro Ala Leu Gly Ile Pro Pro Arg Leu
 260 265 270
 Met Gly Pro Phe Tyr Glu Gln Leu Arg Gly Ser Asp Pro Asn Glu Ala
 275 280 285
 Arg Glu Trp Asn Leu Asp Met Lys Met Ala Trp Arg Glu Ile Val Gln
 290 295 300

Leu Ser Thr Thr Ala Ala Leu Glu Arg Trp Asp Pro Ala Leu Pro Leu
 305 310 315 320
 Glu Gly Ala Val Ala Arg Cys Glu Gln Gly Ala Ile Gly Val Leu Gly
 325 330 335
 Gln Gly Leu Ser Thr His Pro Arg Pro Cys Leu Trp Leu Phe Ser Thr
 340 345 350
 Gln Pro Thr Lys Ala Phe Thr Ala Trp Leu Glu Val Leu Thr Leu Leu
 355 360 365
 Ile Thr Lys Leu Arg Ala Ser Ala Val Arg Thr Phe Gly Lys Glu Val
 370 375 380
 Asp Ile Leu Leu Leu Pro Ala Cys Phe Arg Glu Asp Leu Pro Leu Pro
 385 390 395 400
 Glu Gly Ile Leu Leu Ala Leu Arg Gly Phe Ala Gly Lys Ile Arg Ser
 405 410 415
 Ser Asp Thr Pro Ser Ile Phe Asp Ile Ala Arg Pro Leu His Val Ser
 420 425 430
 Leu Lys Val Arg Val Thr Asp His Pro Val Pro Gly Pro Thr Val Phe
 435 440 445
 Thr Asp Ala Ser Ser Ser Thr His Lys Gly Val Val Val Trp Arg Glu
 450 455 460
 Gly Pro Arg Trp Glu Ile Lys Glu Ile Ala Asp Leu Gly Ala Ser Val
 465 470 475 480
 Gln Gln Leu Glu Ala Arg Ala Val Ala Met Ala Leu Leu Leu Trp Pro
 485 490 495
 Thr Thr Pro Thr Asn Val Val Thr Asp Ser Ala Phe Val Ala Lys Met
 500 505 510
 Leu Leu Lys Met Gly Gln Glu Gly Val Pro Ser Thr Ala Ala Ala Phe
 515 520 525
 Ile Leu Glu Asp Ala Leu Ser Gln Arg Ser Ala Met Ala Ala Val Leu
 530 535 540
 His Val Arg Ser His Ser Glu Val Pro Gly Phe Phe Thr Glu Gly Asn
 545 550 555 560
 Asp Val Ala Asp Ser Gln Ala Thr Phe Gln Ala Tyr Pro Leu Arg Glu
 565 570 575
 Ala Lys Asp Leu His Thr Ala Leu His Ile Gly Pro Arg Ala Leu Ser
 580 585 590
 Lys Ala Cys Asn Ile Ser Met Gln Gln Ala Arg Glu Val Val Gln Thr
 595 600 605
 Cys Pro His Cys Asn Ser Ala Pro Ala Leu Glu Ala Gly Val Asn Pro
 610 615 620
 Arg Gly Leu Gly Pro Leu Gln Ile Trp Gln Thr Asp Phe Thr Leu Glu
 625 630 635 640

Pro Arg Met Ala Pro Arg Ser Trp Leu Ala Val Thr Val Asp Thr Ala
 645 650 655
 Ser Ser Ala Ile Val Val Thr Gln His Gly Arg Val Thr Ser Val Ala
 660 665 670
 Ala Gln His His Trp Ala Thr Ala Ile Ala Val Leu Gly Arg Pro Lys
 675 680 685
 Ala Ile Lys Thr Asp Asn Gly Ser Cys Phe Thr Ser Lys Ser Thr Arg
 690 695 700
 Glu Trp Leu Ala Arg Trp Gly Ile Ala His Thr Thr Gly Ile Pro Gly
 705 710 715 720
 Asn Ser Gln Gly Gln Ala Met Val Glu Arg Ala Asn Arg Leu Leu Lys
 725 730 735
 Asp Lys Ile Arg Val Leu Ala Glu Gly Asp Gly Phe Met Lys Arg Ile
 740 745 750
 Pro Thr Ser Lys Gln Gly Glu Leu Leu Ala Lys Ala Met Tyr Ala Leu
 755 760 765
 Asn His Phe Glu Arg Gly Glu Asn Thr Lys Thr Pro Ile Gln Lys His
 770 775 780
 Trp Arg Pro Thr Val Leu Thr Glu Gly Pro Pro Val Lys Ile Arg Ile
 785 790 795 800
 Glu Thr Gly Glu Trp Glu Lys Gly Trp Asn Val Leu Val Trp Gly Arg
 805 810 815
 Gly Tyr Ala Ala Val Lys Asn Arg Asp Thr Asp Lys Val Ile Trp Val
 820 825 830
 Pro Ser Arg Lys Val Lys Pro Asp Ile Ala Gln Lys Asp Glu Val Thr
 835 840 845
 Lys Lys Asp Glu Ala Ser Pro Leu Phe Ala
 850 855

<210> 8

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 8

gatgactyga attcatgcgt cgcgcgtgcc gtcgcgcgtcg cactgtttgcg ctacatctgg 60
 5'

<210> 9

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 9
 gatgactgga attcatgaga ggcagccacc atcaccatca ccatactggt gcgctacatc 60
 tgggt 65

<210> 10
 <211> 425
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<400> 10
 ctgttttggc ggatgagaga agatttttcag cctgatacag attaaatcag aacgcagaag 60
 cgggtctgata aaacagaatt tgcctggcgg cagtagcgcg gtgggtccac ctgaccccat 120
 gccgaactca gaagtgaaac gccgtagcgc cgatggtagt gtgggggtctc cccatgcgag 180
 agtaggggaa tgccaggcat caaataaaaac gaaaggctca gtcgaaagac tgggcctttc 240
 gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag gacaaatccg ccgggagcgg 300
 atttgaacgt tgcgaagcaa cggcccgag ggtggcgggc aggacgcccg ccataaaactg 360
 ccaggcatca aattaagcag aaggccatgc tgacggatgg cttttttgog tttctacaaa 420
 ctttt 425

<210> 11
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 11
 aaaactgcag agcagtaagc cggtcataaa a 31

<210> 12
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 12
 aaaactgcag cgtgctggat gaagtgtatt a 31

<210> 13
 <211> 2155
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<400> 13
 atcagaatttt tttttttttt ttttttttga agggggggaag ccttcattccc attttctctgg 60
 ttaactagccg ggaaaaccacg taagctccgg cgtcaccat aacagatacg gactttctca 120
 aagtagaggtt atcaatgaat attcgtccat tgcattgacg cgtgatcgtc aagcgtaaaag 180
 aagttgaaac taaatctgct ggccggcatcg ttctgaccgg ctctgcagcg gctaaatcca 240
 ccggcgggcga agtgcctggct gtccggcaatg gccgtatcct tgaaaatggc gaagtgaagc 300
 cgtggatgt gaaagttggc gacatcgta ttttcaacga tggctacggt gtgaaatctg 360
 agaagatcga caatgaagaa gtgttgatca tgtccgaaaag cgacattctg gcaattgttg 420
 aagcgtaatc cgcgcacgac actgaacata cgaatttaag gaataaagat aatggcagct 480
 aaagacgtaa aattcggtaa cgacgctcgt gtgaaaatgc tgcgcggcgt aaacgtactg 540
 gtagatgcag tgaaaagttac cctcgggtcca aaaggccgta acgtagttct ggataaatct 600
 ttccggtgcac cgaccatcac caaagatggt gtttccggtg ctctgtgaaat cgaactggaa 660
 gacaagtctg aaaatatggg tgcgcagatg gtgaaaagaag ttgcctctaa agcaaacgac 720
 gctgcaggcg acggtaccac cactgcaacc gtactggctc aggtatcat cactgaaggt 780
 ctgaaaagctg ttgctgcggg catgaacccg atggacctga aacgtgggtat cgacaaaagcg 840
 gttaccgctg cagttgaaga actgaaaagc ctgtccgtac catgctctga ctctaaagcg 900
 attgctcagg ttggtaccat ctccgctaac tccgacgaaa ccgtaggtaa actgatcgtc 960


```

gaagcgatgg acaaagtcgg taaagaaggg gttatcacgg ttgaagacgg tacgggtctg 1020
caggacgaac tggacgtggt tgaaggtatg cagttcgacc gtggtacact gtctccttac 1080
ttcatcaaca agccggaaaac tggcgagta gaactggaaa gccgttcat cctgctggct 1140
gacaagaaaa tctccaacat ccgcgaaatg ctgcccgttc tggaaagtgt tgcctaaagca 1200
ggcaaacccgc tgcctgatcat cgcctgaagat gtagaaggcg aagcgctggc aactctgggt 1260
gttaaacacca tgcgtggcat cgtgaaagtc gctgcggtta aagcacggg cttcggcgat 1320
cgctgtaaaag ctatgctgca ggatatcgca accctgactg gcggtacagt gatctctgaa 1380
gagatcggtta tggagctgga aaaagcaacc ctggaaagac tgggtcaggg taaactgtgt 1440
gtgatcaaca aagacaccac cactatcacc gatggcggtg gtgaagaagc tgcaatccag 1500
ggcgtgtgtg ctacagatccg tcagcagatt gaagaagcaa cttctgacta cgaccgtgaa 1560
aaactgcagg aacgcgtagc gaaactggca ggcgcggttg cagttatcaa agtgggtgct 1620
gctaccgaag ttgaaatgaa agagaaaaaa gcacgcgttg aagatgccct gcacgcgacc 1680
cgtgctgcgg tagaagaagg cgtggttgct ggtggtggtg ttgcgctgat ccgcgtagcg 1740
tctaaactgg ctgacctgcg tggtcagAAC gtagaccaga acgtgggtat caaagtgtga 1800
ctgcgtgcaa tggaaagctcc gctgcgtcag atcgtattga actgcggcga agaaccgtct 1860
gttgttgcta acaccgttaa aggcggcgac ggaactacg gttacaacgc agcaaccgaa 1920
gaatacggca acatgatcga catgggtatc ctggatccaa ccaaaagtaac tcgttctgct 1980
ctgcagtacg cagcttctgt ggcctggcctg atgatccaca ccgaatgcat ggttacccgac 2040
ctgccgaaaa acgatgcagc tgacttaggc gctgctggcg gtatgggagg catgggtggc 2100
atgggcggga tgatgtaatt gccctgcacc tgcagaaat aaacaaaccc ccggg 2155

```

<210> 14

<211> 3139

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 14

```

atgggtaaaa taattggtat cgacctgggt actaccaact cttgtgtagc gattatggat 60
ggcaccactc ctgcgctgct ggagaacgcc gaaggcgatc gcaccacgcc ttctatcatt 120
gcctataccc aggatggtga aactctagtt ggtcagccgg cttaaacgtca ggcagtgaag 180
aaccgcgcaa acactctggt tgcgattaaa cgcctgattg gtccgcgtt ccaggacgaa 240
gaagtacagc gtgatgtttc catcatgcgc ttcaaaatta ttgctgctga taacggcgac 300
gcattgggtcg aagttaaagg ctgaaaaatg gcaccgcgcg agatttctgc tgaagtgcgt 360
aaaaaaatga agaaaaacgc tgaagattac ctgggtgaac cgttaactga agctgttatt 420
acgtacccgg catactttaa cgtatgctcag cgtcaggcaa ccaaaagacg aggcgtatc 480
gtggtgtcgg aagtaaaacg tatcatcaac gaaccgacgg cagctgcgct ggttaacggt 540
ctggacaaag gcactggcaa cgtactatc cgggtctatg acctgggtgg tggtaacttc 600
gatatttcta ttatcgaaat cagcgaagtt gacggcgaaa aaaccttoga agttctggca 660
accaacggtg ataccacact ggggggtgaa gaattcgaca gccgtctgat caactatctg 720
gttgaagaat tcaagaaaga tcagggcatt gacctgcgca acgatccgct ggcaatgcag 780
cgctgaaag aagcggcaga aaaagcgaaa atogaactgt ctcccgctca gcagaccgac 840
gttaacctgc catacatcac tgcagacggc acgggtccga aacacatgaa catcaaagt 900
actcgtgcga aactggaaag cctggttgaa gatctggtaa accgttccat tgagccgctg 960
aaagtgtcac tgcaggacgc tggcctgtcc gtatctgata tcgacgacgt tatcctcggt 1020
ggtggtcaga ctcgatgac aatggttcag aagaaagtgt ctgagttctt tggtaaagag 1080
ccgcgtaaaag acgttaaccc ggacgaagct gtagcaatcg gtgctgctgt tcagggtggt 1140
gttctgactg gtgacgtaaa agacgtactg ctgctggaag ttaccocgct gtctctgggt 1200
atcgaaacca tgggtggtgt gtgacgagc ctgctgcga aaaaacccc tatcccgacc 1260
aagcacagcc aggtgttctc taccgctgaa gacaaccagt ctgoggtaac catccatgtg 1320
ctgcagggtg aacgtaaacg tgcgctgat aacaaatctc tgggtcagtt caacctagat 1380
ggtatcaacc cggcaccgcg cggcatgccc cagatcgaag ttaccttoga tatcgatgct 1440
gacggtatcc tgcacgtttc cgcgaaagat aaaaacagcg gtaaagagca gaagatcacc 1500
atcaaggctt cttctggtct gaacgaagat gaaatccaga aaatggtacg cgaacgagaa 1560
gctaaccgcg aagctgaccg taagtttgaa gagctggtac agactcgcaa ccaggcgac 1620
catctgctgc acagcaccgg taagcaggtt gaagaagcag gcgacaaact gccggctgac 1680
gacaaaactg ctatcgagtc tgcgctgact gcactggaaa ctgctctgaa aggtgaagac 1740
aaagccgcta tcgaagcgaa aatgcaggaa ctggcacagg ttccccagaa actgatggaa 1800
atcgcccgac agcaacatgc ccagcagcag actgcccgtg ctgatgcttc tgcacaaac 1860
cgcataaacg ggtaattat actgacagg gcaaggga atttctctc cgcctgtgca 1920
ttcatctagg ggcaatttaa aaaagatggc taagcaagat tattaagaga ttttaggct 2040
ttccaaaaaa ggggaagagc gtgaaatcag aaaggcctac aaacgcctgg ccatgaaata 2100
ccaccgggac cgttaaccag gtgacaaaga ggcgaggcg aaatttaaag agatcaagga 2155

```

```

agcttatgaa gttctgaacg actcgcaaaa acgtgcggca tacgatcagt atggtcatgc 2220
tgogtttgag caagggtggca tgggcggcgg cggtttttggc ggccggcgcag acttcagcga 2280
tattttttjgt gacgtttttcg gcgataatttt tggcggcgga cgtgggtcgtc aacgtgcggc 2340
ggcgcggtgct gattttaacgt ataacatgga gctcacccctc gaagaagctg tacgtggcgt 2400
gaacaaaagag atccgcattc cgactctgga agagtgtgac gtttgccacg gtagcgggtgc 2460
aaaaccaggt acacagccgc agacttgccc gacctgtcat ggttctggtc aggtgcagat 2520
ggccagggga ttcttcgctg tacagcagac ctgtccacac tgtcagggcc gcggtacgt 2580
gatcaaaagat ccgtgcaaca aatgtcatgg tcatggctgt gttgagcgca gcaaaacgct 2640
gtccgttaaaa atcccgccag ggggtggacac tggagaccgc atccgtcttg cgggcgaagg 2700
tjaagcgggc jagcatggcg caccggcagg cgatctgtac gttcaggttc aggttaaaaca 2760
gcacccgatt ttcgagcgtg aaggcaacaa cctgtattgc gaagtccga tcaacttcgc 2820
tatggcggcg ctgggtggcg aaatcgaagt accgacctt gatggtcgcg tcaaactgaa 2880
agtgcctggc gaaacccaga ccgtaagct attccgtatg ccgggtaaag gcgtcaagtc 2940
tgtccgcggt ggccgcacagg gtgatttgcg gtgcgcgctt gtcgtcgaaa caccggtagg 3000
cctgaacgaa aggcagaaac agctgctgca agagctgcaa gaaagcttcg gtggcccaac 3060
cgccgagcac aacagcccgc gctcaaagag cttctttgat ggtgtgaaga agttttttga 3120
cgacctgacc cgctaataa 3139

```

<210> 15
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 15
 cccccccggg atgggtaaaa taattggtat cgac 34

<210> 16
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 16
 cgcgggatcc ttattagcgg gtcaggctgt caaaaaa 37

<210> 17
 <211> 594
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

```

<400> 17
atgagtayta aagaacagaa aacgcctgag gggcaagccc cgggaagaaat tatcatggat 60
agcaccgaag agattgaggg agttgagcca gaaccttctg ctgagcaggt ggatcccgcc 120
gatgaaaaag ttgcgaatct cgaagctcag ctggctgaag cccagaccgg tgaacgtgac 180
ggcatttttg gtgtaaaagc cgaatggaa aacctgcgtc gtcgtactga actggatatt 240
gaaaaagccc acaaatctgc gctggagaaa ttcataacag aattgctgcc ggtgattgat 300
agcctggatc gtgcgctgga agtggctgat aaagctaacc cggatatgtc tgcgatgggt 360
gaaggcattg agctgacgt gaagtcgatg ctggatgttg tgcgtaagtt tggcgttgaa 420
gtgatcgccg aaactaacgt cccactggac ccgaatgtgc atcaggccat cgcaatgggt 480
gaatctgatg acgttgccgc aggtaacgta ctgggcatta tgcagaaggg ttatacgtg 540
aatggtcgta cgattcgtgc ggcgatggtt actgtagcga aagcaaaagc ttaa 594

```

<210> 18
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 18

cgcggaattc atgagtagta aagaacagaa aacg

34

<210> 19

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 19

aaaactgcag ttattaagct tttgctttcg ctacagt

37

<210> 20

<211> 2574

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 20

```

atgctgtctgg atcgtcttac taataaattc cagcttgctc ttgcgatgc ccaatcactt 60
gcactcgggc acgacaacca atttatcgaa ccacttcatt taatgagcg cctgctgaat 120
caggaagggg gttcggtttag tcttttatta acatccgctg gcataaatgc tggccaggtt 180
cgcacagata tcaatcaggc attaaatcgt ttaccgcagg ttgaaggtag tgggtggtgat 240
gtccagccat cacaggatct ggtgcgcgtt cttaattctt gcgacaagct ggcgcaaaaa 300
cgtggtgata acttttatct gtcagaactg ttctgtcttg cggcacttga gtctcgcggc 360
acgctggcgc acatcctgaa agcagcagg gcgaccacgc ccaacattac tcaagcgatt 420
gaacaaatgc gtggaggtga aagcgtgaac gatcaagggt ctgaagacca acgtcaggct 480
ttgaaaaaat ataccatcga ccttaccgaa cgagccgaac agggcaaaat ccatccggtg 540
attggtcgtg atgaagaaat tgcgcgtacc attcaggtgc tgcacgctcg tactaaaaat 600
aaccgggtac tgattggtga acccgcgctc ggtaaaaact ccatcgttga aggtctggcg 660
cagcgtatta tcaacggcga agtgccggaa ggggttgaaag gcgcgcgggt actggcgctg 720
gatatggcgc cgtggtggc tggggcgaaa tatcgcgtg agtttgaaga acgtttaaaa 780
ggcgtgctta acgatcttgc caaacaggaa ggcacgctca tctatttat cgaagaaata 840
cataccatgg tgggcgcggg taaagccgat ggcgcaatgg acgcgggaaa catgctgaaa 900
ccggcgctgg cgcgtggtga attgcactgc gtagggtgca cgaagcttga cgaatatcgc 960
cagtaacattg aaaaagatgc tgcgctggaa cgtcgtttcc agaaagtgtt tgttgccgag 1020
cctctgtttg aagataccat tgcgattctg cgtggcctga aagaaagtta cgaattgcac 1080
caccatgtgc aaattactga ccggcaattc gttgcagcgg cgaagcttgc tcatcgctac 1140
attgctgacc gtcagctgac ggtataagcc atcgacctga tcatgaagg agcatccagc 1200
attcgtatgc agattgactc aaaaacagaa gaactcgacc gaactcgatc tcatatcacc 1260
cagctcaaac tggaaacaaca ggcgttaatg aaagagctct atgaagccag taaaaaacgt 1320
ctgggatatgc tcaacgaaga actgagcgac aaagaaagtc agtactccga gttagaagaa 1380
cagtggaaaag cagagaaggc atcgtttctt ggtacgcaga ccattaaagg ggaactggaa 1440
caggcgaaaa tccgtattta acacgtctgc cgtgtggggg acgtggcgcg catgtctgaa 1500
ctgcaatacg gcaaaatccc ggaactggaa aagcaactgg aagccgcaac gcagctcgaa 1560
ggcaaaaacta tgcgtctgtt gcttaataaa gtgaacgaag ccgaaattgc tgaagtgtct 1620
ggcgtttgga cgggggattcc ggtttctctc atgatggaaa gcgagcgcca aaaaactgct 1680
cgtatggagc aagaactgca ccatcgctga attggtcaga acgaagcgtt tcatgggcta 1740
tctaacgcta ttcgtcgtag ccgtcggggc ctggcggtac caaatcgccc gattggttca 1800
tctctgttcc tgggcaccaac tgggtgtgggg aaaaacagagc tttgtaaggc gctggcgaa 1860
tttatgtttg atagcgacga ggcgatgggc cgtatcgata tgtccagatt tatggagaaa 1920
cactcgggtg ctctgtttgt tggtcgcgct ccgggatatg tccgttatga agaaggtggc 1980
taactgaccc aagcgggtgg tctcgtctcc tattccgtca tctgtctgga tgaagtggaa 2040
aaagcgcata ccgatgtctt caacattctg ttgcaggtac tggatgatgg gcgtctgact 2100
gacgggcaag ggagaaacgt cgaactccgt aatacggctc tcattatgac ctctaacctc 2160
ggttcagata tgattcagga acgcttcggt gaactggatt atgcgcacat gaaagagctg 2220
gtgctcgggt tggtaagcca taacttcgt ccggaattca ttaacgttat ccatgaagtg 2280
gtggtcttcc atccgctgg tgaacagcac attgcctcga ttgcgcagat tcagttgaaa 2340
cgtctgtaca aacgtctgga agaacgtggt tatgaaatcc acatttctga cgaagcgctg 2400

```

aaactgctga gcgagaacgg ttacgatccg gtctatggcg cacgtcctct gaaacgtgca 2460
 attcagcagc agatcgaaaa cccgctggca cagcaaatac tgtctgggtga attgggtccg 2520
 ggtaaagtga ttgccttgga agttaatgaa gaccggattg tcgccgtcca gtaa 2574

<210> 21
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 21
 aaaactgcag atgcgtcttg atcgtcttac taat 34

<210> 22
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 22
 ccgggaagc ttattactgg acggcgacaa tccggtc 37

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer aktiven heterodimeren AMV-RT in prokaryotischen Wirtszellen, dadurch gekennzeichnet, daß,
 - (i) eine oder mehrere DNA-Sequenz(en), die für die α - und/oder β -Kette der AMV-RT kodieren, in Expressionsplasmide kloniert werden,
 - (ii) die Expressionsplasmide in prokaryotische Zellen transformiert werden,
 - (iii) die lösliche Expression der heterodimeren AMV-RT induziert wird und
 - (iv) die rekombinante heterodimere AMV-RT aus den Zellen isoliert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die für die α - und β -Kette kodierenden DNA-Sequenzen auf getrennten Expressionsplasmiden kloniert in einer Zelle exprimiert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die für α - und β -Kette kodierenden DNA-Sequenzen auf einem Expressionsplasmid kloniert in einer Zelle exprimiert werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl die α - als auch die β -Kette mit einer Peptidsequenz fusioniert ist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die α - oder β -Kette mit einer Peptidsequenz bestehend aus 2 bis 10 Argininresten und die β - oder α -Kette mit einer Peptidsequenz bestehend aus 2 bis 10 Histidinresten fusioniert sind.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die für die α - und β -Kette kodierenden DNA-Sequenzen, die mit für zur reversiblen Bindung befähigte Peptidsequenzen kodierenden DNA-Sequenzen verbunden sind, auf einem Expressionsplasmid kloniert in einer Zelle exprimiert werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß α - und β -Kette mit der gleichen zur reversiblen Bindung befähigten Peptidsequenzen fusioniert sind.

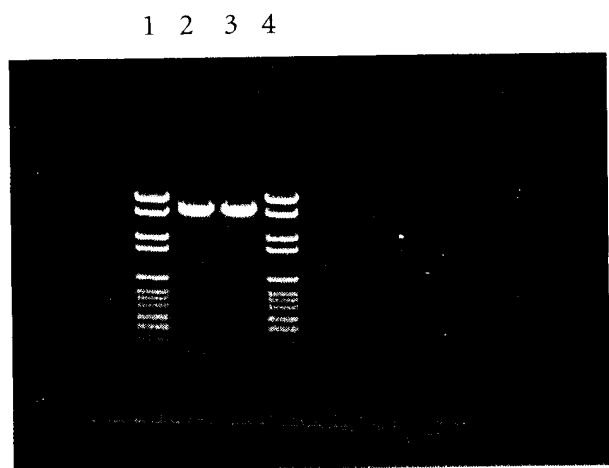
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß α - und β -Kette jeweils mit einer Peptidsequenz bestehend aus 2 bis 10 Histidinresten fusioniert sind.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression bei einer Wachstumstemperatur von 10° bis 25°C und einer erniedrigten Induktorkonzentration erfolgt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression durch Coexpression von Hilfsgenen gesteigert wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Hilfsgen das *trpT*-Gen, das für die Tryptophan-tRNA kodiert, verwendet wird.
12. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression durch Coexpression von Chaperongen erhöht wird.
13. Verfahren nach Anspruch 10 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene für GroEL und GroES, DnaK und DnaJ, GrpE und/oder ClpB coexprimiert werden.
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene für GroEL und GroES auf dem Expressionsplasmid, das auch die Gene für die α - und die β -Kette trägt, kloniert sind und die Gene für DnaK, DnaJ, GrpE und ClpB auf einem Helferplasmid kloniert sind.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß zur Isolierung bzw. Aufreinigung der rekombinanten heterodimeren AMV-RT geeignete Affinitätschromatographiematerialien verwendet werden.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Aufreinigung verwendeten Affinitätschromatographiematerialien die unterschiedlichen, an die α - und/oder β -Kette gebundenen Peptidsequenzen, reversibel gebunden.
17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Aufreinigung verwendeten Affinitätschromatographiematerialien metallionenchelatisierende Materialien oder Kationenaustauscher sind.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz SEQ ID NO: 5 oder die DNA-Sequenzen SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 5 in einer prokaryotischen Wirtszelle exprimiert werden.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß *E. coli* als Wirtszelle verwendet wird.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die aktive heterodimere AMV-RT aus den Untereinheiten SEQ ID NO: 6 und SEQ ID NO: 7 besteht.
21. Verwendung einer nach dem Verfahren der Ansprüche 1 bis 20 erhältlichen AMV-RT zur Amplifikation von RNA-Sequenzen

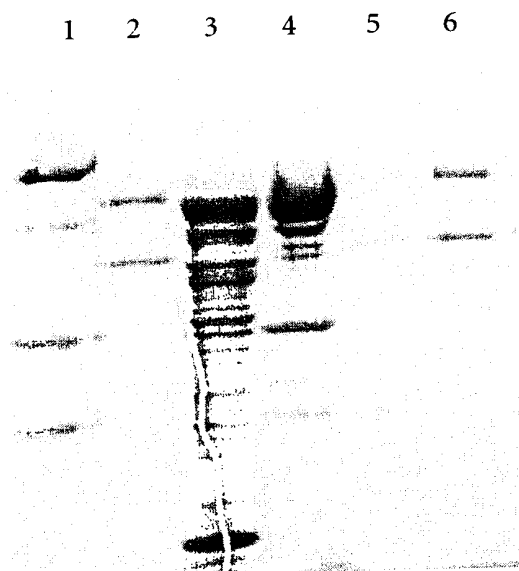
Zusammenfassung:

In der vorliegenden Erfindung wird die heterologe Expression der Reversen Transkriptase aus dem *Avian Myeloblastosis Virus* (AMV-RT) in prokaryotischen Zellen, insbesondere *Escherichia coli* (*E. coli*) beschrieben. Die Erfindung beinhaltet ebenfalls bestimmte Maßnahmen zur vereinfachten Aufreinigung der heterodimeren AMV-RT.

Figur 1



Figur 2



Figur 3

